

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

**Regulation der Akkumulation des Transkriptionsfaktors  
Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 $\alpha$  in humanen  
Ovarialkarzinom-Zelllinien**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinischen Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Christina Heilmaier  
aus Krefeld  
Essen 2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Fandrey

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Januar 2006

## Inhaltsverzeichnis

### 1. Einleitung

1.1	Tumorbiologie der Ovarialkarzinome	1
1.2	Oxygenierung von Tumorgewebe	2
1.3	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1)	3
1.4	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	5
1.5	Proinflammatorische Zytokine	7
1.6	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	9

### 2. Material und Methoden

2.1	Zellkulturen	10
2.2	Isolation der Gesamt-RNA aus Zellkulturen mit saurem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	11
2.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	13
2.4	Nachweis spezifischer mRNAs	14
2.4.1	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	16
2.4.2	Polymeraseketten-Reaktion (PCR)	16
2.5	Proteinbestimmung	18
2.6	Immunoblot (Western Blot) für den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$	19
2.7	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) für VEGF	25
2.8	Präparation von Proteinkernextrakten	26
2.9	Electrophoretic-mobility-shift-assay (EMSA) zum Nachweis der DNA-Bindung von HIF-1	27

2.10	Reportergenassay	32
2.10.1	Reportergenassay mit dem Vektor pH3SVL	33
2.10.2	Reportergenassay mit dem Gal4-Hybridsystem	36
2.11	Statistik	38

### 3. Ergebnisse

3.1	Untersuchungen zur Regulation von HIF-1	39
3.1.1	Hypoxie als Stimulus für die Bildung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA	39
3.1.2	Hypoxie als Stimulus für die Akkumulation des HIF-1 $\alpha$ Proteins	40
3.1.3	Bestimmung der Stabilität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins	41
3.1.4	Untersuchungen über den Einfluss des Zytokins Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) auf die HIF-1 $\alpha$ -Genexpression	43
3.1.5	Untersuchungen über den Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ auf den HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt	44
3.1.6	Bestimmung der Stabilität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins bei Anwesenheit des Zytokins IL-1 $\beta$	45
3.1.7	Untersuchung der Bindungsaktivität des HIF-1-Komplexes mithilfe des Electrophoretic-mobility-shift-assays (EMSA)	47
3.1.8	Überprüfung der Transkription-steigernden Aktivität von HIF-1 $\alpha$ mithilfe des Reportergenassays mit dem Vektor pH3SVL	50
3.1.9	Untersuchungen zur Transkription-steigernden Aktivität des C-Terminus von HIF-1 $\alpha$ mithilfe des Reportergenassays mit dem Vektor Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TAD-C	53
3.2	Untersuchungen zur Bildung von VEGF	56
3.2.1	Hypoxie als Stimulus für die Expression des Gens für VEGF	56

---

3.2.2	Bestimmung der VEGF-Proteinbildung unter Hypoxie	57
3.2.3	Untersuchungen über den Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ auf die VEGF-Genexpression	59
3.2.4	Bestimmung der VEGF-Proteinsekretion unter dem Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ mithilfe des ELISAs	60
 <b>4. Diskussion</b>		
4.1	Die Regulation von HIF-1 $\alpha$	64
4.2	Die Regulation von VEGF	68
4.3	Der Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ auf HIF-1 $\alpha$	68
4.4	Die Expression von VEGF unter Einfluss von IL-1 $\beta$	72
 <b>5. Zusammenfassung</b>		75
 <b>6. Literaturverzeichnis</b>		76
 <b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>		94
 <b>8. Anhang</b>		97
8.1	Geräte	97
8.2	Zellkulturartikel	98
8.3	Chemikalien	98
8.4	Weitere Materialien	100
 <b>9. Danksagung</b>		101
 <b>10. Lebenslauf</b>		102

## 1. Einleitung

### 1.1 Tumorbilogie der Ovarialkarzinome

Das Ovar als Ursprungsort für eine Reihe sowohl gutartiger als auch bösartiger Tumoren liegt als paariges weibliches Geschlechtsorgan im kleinen Becken. Neben den Tumoren, die primär im Ovar entstehen, wird das Ovar häufig durch Metastasen anderer Krebserkrankungen befallen, wie zum Beispiel vom Brust- oder Lungenkarzinom. Der häufigste bösartige Tumor, der vom Ovar ausgeht, ist das Ovarialkarzinom. Bei diesem werden histologisch wiederum eine muzinöse, eine seröse und eine endometriale Form unterschieden (Stauber et al., 2001).

Die Ursachen für die Entstehung des Ovarialkarzinoms konnten bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Vermutlich kommt dem sich regelmäßig wiederholenden Eisprung eine entscheidende Bedeutung zu. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass an diesem Karzinom häufiger Frauen erkranken, die niemals den Eisprung unterdrückende Kontrazeptiva nahmen („Pille“) und damit immer einen Eisprung hatten (Stauber et al., 2001). Ferner scheinen Kontakte mit Stoffen wie Asbest oder Talkum den Ausbruch der Krankheit zu fördern (Stauber et al., 2001). In etwa 10 % der Erkrankungen konnte eine genetische Disposition festgestellt werden, wobei das gleichzeitige Auftreten von anderen Karzinomen gehäuft beobachtet wurde (Koppenwallner, 2003).

Verglichen mit anderen bösartigen Tumoren, wie zum Beispiel dem Brust- oder Lungenkrebs, tritt das Ovarialkarzinom eher selten auf; die Inzidenz beträgt ca. 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen im Jahr (Stauber et al., 2001). Der Altersgipfel liegt hierbei zwischen dem 7. und 8. Lebensjahrzehnt, also jenseits der Menopause. Da die Diagnose zumeist erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, nimmt das Ovarialkarzinom eine führende Rolle bei den Krebstodesursachen ein. Der Grund für das späte Erkennen der Erkrankung ist unter anderem das Fehlen typischer Frühsymptome. Erste Hinweise sind uncharakteristisch, wie z.B. Schmerzen im Unterbauch, Obstipation oder bei älteren Patientinnen das erneute Auftreten der

scheinbaren Regelblutung nach der Menopause. In fortgeschrittenen Stadien ist das Auftreten von Aszites wegweisend, bei dem es zu einer massiven Zunahme des Leibesumfanges kommt (Stauber et al., 2001).

In circa der Hälfte der Fälle sind beide Ovarien betroffen. Durchbricht das Karzinom die Grenzen der Ovarien, kann es zum Befall der gesamten Oberfläche der Bauchhöhle, des Zwerchfells sowie des Douglas-Raumes kommen. Die Ausbreitung des Karzinoms in der Bauchhöhle wird als Peritonealkarzinose bezeichnet und geht zumeist mit einer deutlich schlechteren Prognose einher.

Erhält das Karzinom Anschluss an das Blutsystem, so treten bevorzugt in Pleura, Leber, Lunge oder Gehirn Metastasen auf. Mit dem Lymphstrom können besonders die paraaortalen und iliakalen Lymphknoten befallen werden (Koppenwallner, 2003). Anhand der Figo-Klassifikation (Fédéral Institut de Gynécologie et d'Obstétrique) wird das Karzinom unter Einbeziehung klinischer und pathologisch-anatomischer Befunde in 4 Tumorstadien eingeteilt. Das therapeutische Vorgehen richtet sich nach der Ausbreitung der Krankheit und der Verfassung der Patientin und besteht zumeist aus einer Kombination von Operation, Chemotherapie und Bestrahlung (Stauber et al., 2001).

## **1.2. Oxygenierung von Tumorgewebe**

Expansives Wachstum des Tumors führt schnell zu einer unzureichenden Gefäßversorgung (Böcker et al., 2000).

Voraussetzung für das Wachstum des Tumors ist jedoch seine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen. Hierfür ist es erforderlich, dass der Tumor Anschluss an das Gefäßsystem erhält, was unter anderem durch die Ausbildung neuer Gefäße erreicht wird (Folkman, 2002). Durch Veränderungen in der Umgebung des Tumors kommt es zur Aktivierung von Genen, die normalerweise nicht oder nicht in solchem Ausmaß exprimiert werden. Diese Gene fördern unter

anderem die Neubildung von Gefäßen (Kim et al., 2003), die neben der Nährstoffversorgung des Tumors auch seine Metastasierung ermöglichen.

Eine besondere Rolle spielt hierbei die verminderte Sauerstoffkonzentration (Hypoxie) im Gewebe, die besonders durch die rasche Größenzunahme des Karzinoms hervorgerufen wird. Die unter diesen Bedingungen aktivierten Gene bezeichnet man als Hypoxie-induzierte Gene. Die Charakterisierung dieser Gene war in den vergangenen Jahren Gegenstand des Interesses vieler Forschungsgruppen (Nakayama et al., 2001; Horiuchi et al., 2002; Buchler et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (Hypoxia-inducible factor-1; HIF-1) auf die Expression des Gens für den Gefäßwachstumsfaktor Vascular endothelial growth factor (VEGF) untersucht.

### **1.3. Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1)**

Viele Prozesse zur Aufrechterhaltung einer genügenden Sauerstoffversorgung werden durch den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) reguliert, der die Expression einer Reihe von Hypoxie-induzierbaren Zielgenen beeinflusst (Wenger, 2002). Die Erforschung des Faktors und die Kenntnis seiner Regulations- und Funktionsweise nimmt daher eine zentrale Rolle bei der Untersuchung von Krankheiten ein, die mit einer Veränderung der Gewebeoxygenierung einhergehen.

Grundlage für die Entdeckung von HIF-1 war die Beobachtung, dass es am 3'-Ende des Erythropoietin-Gens (EPO), dem sogenannten Hypoxia-response element (HRE), zu Protein-DNA-Wechselwirkungen kommt. In vielen Versuchen zeigte sich, dass einer der Faktoren, die mit dem HRE interagieren, lediglich unter Hypoxie an das HRE bindet. Deshalb wurde dieser Faktor von Semenza und Wang (1992) als HIF-1 bezeichnet.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde die Regulation von HIF-1 in einer Reihe verschiedener Zelllinien untersucht (Nakayama et al., 2001; Buchler et al., 2003). Die

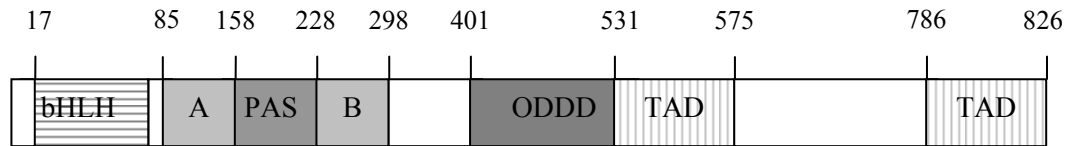


Tatsache, dass HIF-1 auch in Zellen beobachtet werden kann, die das EPO-Gen nicht ausbilden, zeigt, dass HIF-1 Teil eines umfangreichen Sauerstoff-regulierten Systems ist (Maxwell et al., 1993).

HIF-1 ist ein Heterodimer, der aus einer 120 kDa großen  $\alpha$ -Untereinheit (HIF-1 $\alpha$ ) und einer 91-94 kDa großen  $\beta$ -Untereinheit (HIF-1 $\beta$ ) besteht (Wang et al., 1995). Biochemische Untersuchungen ergaben, dass die  $\beta$ -Untereinheit identisch ist mit dem sogenannten AhR Nuclear Translocator (ARNT). ARNT heterodimerisiert sonst mit dem Dioxin Receptor/Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) und ist konstitutiv im Zellkern vorhanden (Hoffman et al., 1991). Die HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit ist Sauerstoff-sensitiv und ihr zellulärer Gehalt ist ausschließlich posttranslational kontrolliert. Am C- und N-Terminus des Proteins befindet sich je eine Transaktivierungsdomäne (TAD-C bzw. TAD-N). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  rasch abgebaut, was vorwiegend durch das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt wird (Salceda et al., 1997). Die Bindung des Von-Hippel-Lindau-Proteins (pVHL) an hydroxylierte Prolinreste in der Oxygen-dependent degradation domain (ODDD) markiert das HIF-1 $\alpha$ -Protein für den proteasomalen Abbau (Jaakkola et al., 2001). Als für die Hydroxylierung der Prolinreste entscheidende Enzyme wurden drei verschiedene Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD1, PHD2, PHD3) identifiziert, deren Aktivität auf Sauerstoff angewiesen ist (Epstein et al., 2001).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass HIF-1 $\alpha$  ein Mitglied der Familie von Transkriptionsfaktoren ist, zu der auch ARNT gehört. Kennzeichen dieser Gruppe von Proteinen sind sowohl die basische Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH) als auch die PAS-Domäne, wobei PAS als Akronym für die Proteine Per/ARNT/Sim steht, bei denen es sich ebenfalls um Mitglieder dieser Familie handelt (Gu et al., 2000).

Während die bHLH-Domäne für die Bindung der HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -Proteine an die DNA verantwortlich ist, erfolgt über die PAS-Domäne die Dimerisierung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  (Wenger, 2002).



**Abb. 1.1 Darstellung der Struktur des HIF-1 $\alpha$ -Proteins:** HIF-1 $\alpha$  gehört einer Proteinfamilie an, deren Charakteristika das grundlegende Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH) sowie die PAS-Domänen sind. Die PAS-Domänen setzen sich aus einer A- (aa. 85-158) und einer B-Untereinheit (aa. 228-298) zusammen. Die Oxygen-dependent degradation domain (ODDD) interagiert mit dem Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Stabilität von HIF-1 $\alpha$ . Als wichtige Bereiche für die Initiation der Transkription besitzt das HIF-1 $\alpha$ -Protein eine N-terminale (aa. 531-575) sowie eine C-terminale (aa. 786-826) Transaktivierungsdomäne (TAD).

Sobald das HIF-1 $\alpha$ -Protein unter Hypoxie stabilisiert ist, wird es in den Zellkern transloziert. Dort dimerisiert es mit HIF-1 $\beta$  und bindet als HIF-1-Komplex an die DNA der Gene, die in ihrem Promotor oder Enhancer Hypoxia-response elements besitzen (Camenisch et al., 2001).

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen erbrachten den Nachweis zweier weiterer HIF-Proteine (HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ ), die in weiten Bereichen ihrer Aminosäuresequenz homolog zu HIF-1 $\alpha$  sind (Ema et al., 1997; Gu et al., 1998).

#### 1.4 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass HIF-1 eine gesteigerte Expression des Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Gens bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck bewirkt (Liu et al., 1995). Im Gegensatz zu Faktoren wie Insulin-like growth factor-I (IGF-I) oder Platelet-derived growth factor (PDGF), die die Aussprossung von Endothelzellen zusammen mit einem Wachstum der Fibroblasten bewirken, fördert VEGF die Gefäßneubildung ausschließlich durch die

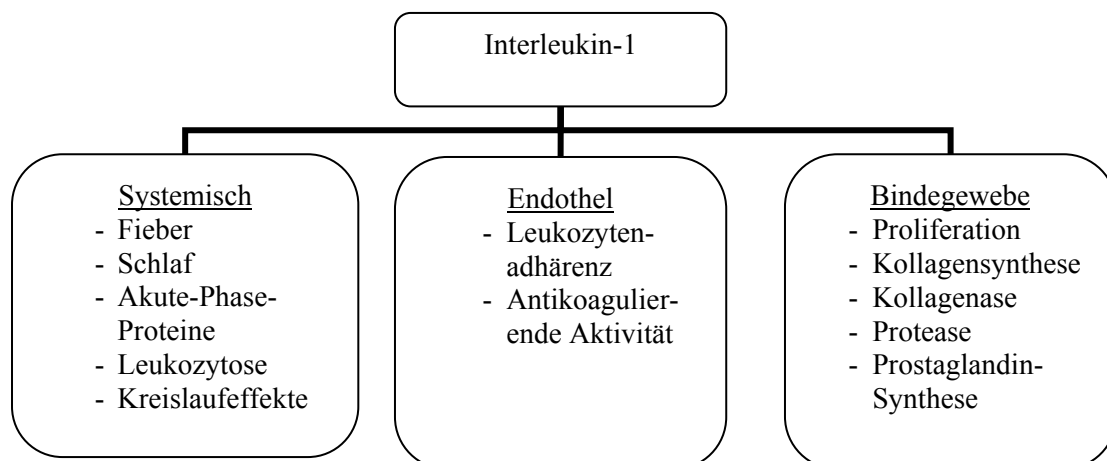
Proliferation von vaskulären Endothelzellen (Ferrara et al., 1997). Ferner erhöht VEGF die Gefäßpermeabilität durch Ausbildung von Undichtigkeiten in der Gefäßwand (Senger et al., 1983). Das hierbei vermehrt extravaskulär nachzuweisende Fibrin bildet ein Gel, das als Substrat für das Wachstum von Endothel- und Tumorzellen dient. VEGF spielt daher eine entscheidende Rolle bei Wachstum und Metastasierung von Tumorgewebe (Ferrara et al., 1997).

In molekularbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das VEGF-Gen aus 8 Exons besteht, die durch 7 Introns getrennt werden (Ferrara et al., 1997). Mindestens 5 Spleißvarianten konnten nachgewiesen werden: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>. Die aus 165 Aminosäuren bestehende Variante VEGF<sub>165</sub> dominiert in Bezug auf Stärke der Expression und Wirksamkeit (Poltorak et al., 2000). Die Analyse des VEGF-Promotors ergab eine 28 bp große Sequenz im 5'-Promotor des Gens von Mensch und Ratte, die die Hypoxie-induzierte Transkription vermittelt. Vergleiche dieser Sequenz mit der HIF-1-Bindungsstelle im EPO-Gen ergaben ein hohes Ausmaß an Homologie und ähnliche Charakteristika in der Proteinbindung. In Transfektionsversuchen von Forsythe et al. (1996) konnte der direkte Einfluss von HIF-1 auf die Hypoxie-induzierte Expression von VEGF gezeigt werden: Reporterkonstrukte, die die für die hypoxische Induzierbarkeit des Gens verantwortlichen VEGF-Sequenzen besitzen, wurden mit Expressionsvektoren cotransfiziert, die für die HIF-1-Untereinheiten kodieren. Es zeigte sich in diesen Zellen eine starke Zunahme der Gentranskription sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie im Vergleich zu den Zellen, die nur die VEGF-Sequenz alleine besaßen (Ferrara et al., 1997).

Allerdings ist die gesteigerte Expression von VEGF unter Hypoxie nicht nur auf den Einfluss von HIF-1 $\alpha$  zurückzuführen. Mehrere Untersuchungen erbrachten den Nachweis, dass unter hypoxischen Bedingungen auch die Stabilität der VEGF-mRNA erhöht ist. Die dafür verantwortliche Sequenz konnte in der 3'-untranslatierten Region der VEGF-mRNA gefunden werden (Ferrara et al., 1997).

## 1.5 Proinflammatorische Zytokine

Zytokine sind Proteine der humoralen Immunabwehr, die unter anderem von aktivierten Monozyten, Makrophagen oder T-Helferzellen gebildet und sezerniert werden. Neben einer Vielzahl weiterer Proteine sind besonders die Interleukine und die Interferone wichtige Zytokine. Interleukine sind Proteine, die von Leukozyten gebildet und in das Blut und/oder die Gewebeflüssigkeit abgegeben werden. Sie haben systemische Wirkung und beeinflussen lokal sowohl das Endothel als auch das Bindegewebe. Ihre Hauptaufgabe ist aber die Stimulation von T-Helferzellen (Kayser et al., 1997).



**Abb. 1.2 Wirkungen von IL-1 auf verschiedene Gewebe im Rahmen einer Immunreaktion:** Das Zytokin IL-1 ist ein Protein, das klassischerweise bei Entzündungsreaktionen vermehrt ausgeschüttet wird. Obwohl seine Hauptaufgabe die Stimulation von T-Helferzellen ist, hat es auch eine Reihe von systemischen Wirkungen und beeinflusst Endothel und Bindegewebe.

Die genauere Betrachtung von IL-1 zeigt, dass es zwei fast identische Formen des Proteins gibt: das aus 159 Aminosäuren bestehende IL-1 $\alpha$  kommt überwiegend bei Mäusen vor, während das 153 Aminosäure große IL-1 $\beta$  die dominierende Form im

Menschen ist (Ibelgauff, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von IL-1 $\beta$  auf die Genexpression der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien HTB-77 und OVCAR-3 untersucht.

Bis heute konnten zwei verschiedene IL-1-spezifische Rezeptoren gefunden werden: der Typ 1-Rezeptor befindet sich überwiegend auf T-Zellen sowie auf Zellen mesenchymaler Herkunft und wird nach der Cluster of Differentiation(CD)-Klassifikation mit CD121 bezeichnet. Er gehört der Immunglobulin-Superfamilie an. Im Gegensatz dazu steht der Typ 2-Rezeptor, der auch mit CD121b bezeichnet wird. Er wird hauptsächlich auf B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen gefunden. Beide Rezeptoren vermitteln ihre intrazellulären Signale über die Adenylatzyklase, deren Aktivierung zu einer Zunahme von zyklischem AMP (cAMP) führt (Ibelgauff, 2003). Zytokine kommen nicht nur bei klassischen Entzündungsreaktionen vor, sondern spielen auch bei Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Durch das Wachstum des Tumors kommt es zu einem Entzündungsreiz im umliegenden Gewebe, was zur Chemotaxis von immunkompetenten Zellen mit nachfolgender Ausschüttung von Zytokinen führt. Versuche ergaben, dass hier besonders das Zytokin IL-1 gehäuft auftritt. Die Auswirkungen von IL-1, wie zum Beispiel die Rekrutierung weiterer Makrophagen, die wiederum IL-1 sezernieren, können die Weiterentwicklung des Tumors wesentlich beeinflussen (Saijo et al., 2002). Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die Aktivierung von HIF-1: an Hepatomzellen konnte gezeigt werden, dass IL-1 zu einer Zunahme der Bindung des HIF-1-Komplexes an die DNA sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie führt. Auch wurde unter IL-1-Einfluß eine Steigerung der HIF-1-Proteinmenge im Kern bei normoxischen und hypoxischen Zellen festgestellt (Hellwig-Bürgel et al., 1999).

### **1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Hypoxie und eines Mediators des Immunsystems auf die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 und des Gefäßwachstumsfaktors VEGF in Tumorzellen zu untersuchen. Da HIF-1 und VEGF eine entscheidende Rolle für die Proliferation und Metastasierung von Tumoren zugeschrieben wird, erhofft man, durch das Verständnis ihrer Aktivierung und Funktion neue Ansätze für die Therapie von Karzinomen zu erlangen. Für die vorliegende Arbeit wurden die beiden Ovarialkarzinomzellen HTB-77 und OVCAR-3 verwendet.

Darüber hinaus könnte es möglich sein, das Verständnis der Hypoxie-induzierten Genexpression zu fördern und dadurch eine bessere Behandlung von Krankheiten zu ermöglichen, bei denen ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck und/oder eine massive Aktivierung des Immunsystems vorhanden sind. Hier seien insbesondere die ischämischen Erkrankungen (z.B. myokardiale Ischämie) sowie die Tumoren erwähnt (Forsythe et al., 1996).

## 2. Material und Methoden

Die verwendeten Geräte, Zellkulturartikel, Chemikalien und weiteren Materialien sind im einzelnen im Anhang aufgeführt.

### 2.1 Zellkulturen

Die humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien Ovc3 und HTB-77 wurden von der Universitätsklinik Innsbruck, Österreich, bezogen (ATCC-Nummer HTB-161 und HTB-77). Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium (Bio Whittaker Europe, Belgien) mit 10 % fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 2,2 g/l Natriumbikarbonat unter Zusatz von Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin (100 U/ml) in 75 cm<sup>2</sup> Polystyrol-Kulturflaschen (Greiner, Nürnberg) gezüchtet. Die Kultivierung erfolgt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) in Luft bei 37°C. Das Medium wurde dreimal wöchentlich erneuert. Bei einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurden sie mit Trypsin von dem Boden der Kulturflaschen abgelöst und auf neuen Platten ausgesät. Für die Versuche wurden die Zellen auf Kulturplatten mit 6 Vertiefungen gezüchtet. Die Experimente wurden mit konfluenten Kulturen, entsprechend einer Zelldichte von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>, durchgeführt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn erhielten alle Kulturen frisches Medium. Je nach Experiment wurden die Proben für die definierte Inkubationszeit in dem Brutschrank bei 21 % O<sub>2</sub> oder 3 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Der Zellrasen wurde einmal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Kulturen, aus denen die Gesamt-RNA isoliert werden sollte, wurden mit 700 µl Guanidiniumthiocyanat-Lösung (4 M) pro Probe versetzt und anschließend bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Kulturen, aus denen eine Protein-Isolierung erfolgen sollte, wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Zell-Lyse-Puffer für 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber abgekratzt. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte sofort.

<u>Guanidiniumthio-</u>	236,25 g	GTC
<u>Cyanat</u>	4,18 ml	NaOAc pH 5,2 (3 M)
<u>4M GTC</u>	auf 500 ml	mit Aqua bidest. auffüllen
		filtrieren
	3,75 ml	β-Mercaptoethanol
<u>10-fach PBS</u>	4,9 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	21 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	81 g	NaCl
	auf 1 l	mit Aqua bidest. auffüllen
<u>RNA-Lyse-Puffer</u>	15 ml	NaCl
	1 ml	Tris pH 7,9 (1 M)
	100 µl	EDTA (1 M)
	600 µl	Nonidet-P 40 (1 M)
	auf 100 ml	mit Aqua bidest. auffüllen

## 2.2 Isolation der Gesamt-RNA aus Zellkulturen mit saurem Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol

Basierend auf der zuerst von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode wurde die Gesamt-RNA aus Zell-Lysaten isoliert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Diese



Methode macht sich das unterschiedliche Lösungsverhalten von Proteinen, DNA und RNA in organischen und wässrigen Lösungsmitteln zunutze: Proteine lösen sich gut in organischen Lösungsmitteln, RNA in wässrigen Lösungen. Die DNA löst sich bei saurem pH ebenfalls in der organischen Phase oder verbleibt in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase.

Das Gemisch aus Zelllysat und 700 µl GTC wurde in ein 2,0 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit 70 µl 2 M NaOAc pH 4,0 versetzt. Anschließend wurden je 560 µl Phenol (pH < 4,5) und Phenol:Chloroform:Isoamyl (Sigma, Deisenhofen) hinzugefügt und die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze bei 4°C und 13000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5415R; Eppendorf, Hamburg). Im Anschluss daran wurde die obere, wässrige Phase abpipettiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 700 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt) gegeben. Die RNA wurde über Nacht bei -20°C präzipitiert und am nächsten Tag erneut für 30 Minuten bei 4°C und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das verbliebene Präzipitat mit 300 µl GTC (Roth, Karlsruhe) resuspendiert, um Reste der organischen Lösungsmittel zu entfernen. Die Proben wurden wieder über Nacht bei -20°C gelagert, wobei zuvor 400 µl Isopropanol hinzugegeben wurde. Nach erneuter 30-minütiger Zentrifugation wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, um eventuell mitgefälltes Salz zu beseitigen. Dann wurden die RNA-Präzipitate kurz getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

<u>0,1 % DEPC Aqua</u>	500 ml	Aqua bidest.
<u>dest.</u>	0,5 ml	Diethylpyrocarbonat (DEPC)
<u>EDTA pH 3,0</u>	186,1g	EDTA
<u>500mM</u>	auf 1l	mit Aqua bidest. auffüllen pH-Einstellung mit NaOH-Plätzchen

<u>2 M NaOAc pH 4,0</u>	16,14 g auf 100 ml	NaOAc wasserfrei mit Aqua bidest. auffüllen pH mit Eisessig einstellen
<u>3 M NaOAc pH 5,2</u>	24,61 g auf 100 ml	NaOAc wasserfrei mit Aqua bidest. auffüllen pH mit Eisessig einstellen
<u>TE-Puffer, pH 7,4</u>	1 ml 0,1 ml auf 1 l	Tris-HCl pH 7,4 (1 M) EDTA pH 8,0 (1 M) mit Aqua bidest. auffüllen
<u>Tris-Puffer, pH 7,4</u> <u>1M</u>	121,1 g auf 1 l	Tris-Base mit Aqua bidest. auffüllen pH-Einstellung mit konzentrierter HCl

### 2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von RNA basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm (Sambrook et al., 1989), für das die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine 1:100 Verdünnung der jeweiligen RNA-Lösungen hergestellt und mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm die Absorption gemessen. Eine Absorption von 1,0 einer RNA-Lösung bei 260 nm entspricht einem RNA-Gehalt von 40  $\mu\text{g/ml}$  (Sambrook et al., 1989). Die RNA-Konzentration der gemessenen Probe errechnet sich dann folgendermaßen:

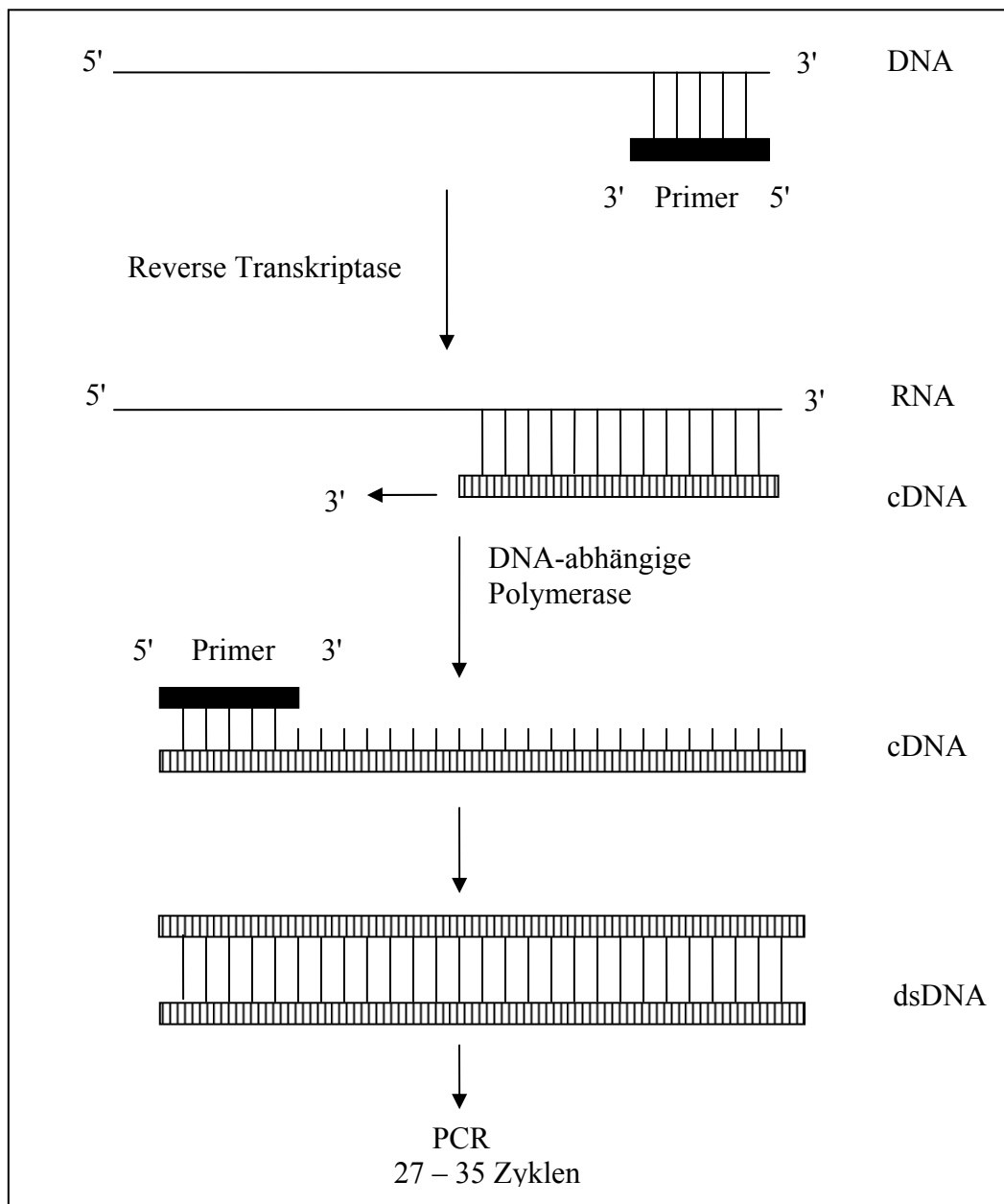
$$\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\text{Absorption bei 260 nm} * 40 \mu\text{g/ml} *}{\text{Verdünnungsfaktor} * 10^{-3}}$$

Um die Reinheit der Nukleinsäurelösung abzuschätzen, wurde zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, wo das Absorptionsmaximum für Proteine liegt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine gute Qualität der RNA-Präparation zu gewährleisten (Sambrook et al., 1989).

#### 2.4 Nachweis spezifischer mRNAs

Der schwierige quantitative Nachweis von kleinsten DNA-Mengen macht es erforderlich, millionenfache Kopien dieser Sequenz herzustellen. Hierfür wurde von Mullis (Mullis et al., 1994) die Methode der Polymeraseketten-Reaktion (PCR) entwickelt. Sie ermöglicht es, selbst kleinste Mengen DNA nachzuweisen.

Mithilfe der PCR wurde die mRNA der Gene HIF-1 $\alpha$  und VEGF qualitativ und quantitativ bestimmt. Für VEGF wurde die Isoform mit 165 Aminosäuren nachgewiesen, da dieser Aminosäure die größte Bedeutung in vivo beigemessen wird (Ferrara et al., 1997). Dieser Nachweis erforderte die Herstellung einer komplementären DNA (cDNA) aus der mRNA, da es sich bei dem entscheidenden Enzym der PCR um eine DNA-abhängige Polymerase handelt. Das Umschreiben der mRNA in eine cDNA erfolgt durch die Reverse Transkription (RT). Die einzelsträngige cDNA komplettiert sich dann zu einem Doppelstrang (dsDNA), der zu Beginn des nächsten Zyklus durch eine Temperaturerhöhung wieder aufgetrennt wird.



**Schema 2.1. Schematische Darstellung der RT-PCR:** Der Nachweis der mRNA von Genen mittels PCR erfordert die Herstellung einer komplementären DNA (cDNA) aus der mRNA. Dieses Umschreiben der RNA erfolgt durch das Enzym Reverse Transkriptase, das von einem kurzen DNA-Fragment (Primer) ausgehend die Synthese der cDNA beginnt. An die neusynthetisierte einzelsträngige cDNA binden sich Primer. Sie sind Ausgangspunkte für die Amplifikation des Einzelstrangs der cDNA durch die DNA-abhängige Polymerase. Der PCR-Ablauf mit Denaturierung, Binden der Primer an den Einzelstrang (Annealing) und Primerextension wird in Abhängigkeit vom Gen mit 27 – 35 Zyklen durchgeführt.  
dsDNA = doppelsträngige DNA

### 2.4.1 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Von den RNA-Präparationen aus den Zellkulturen wurden 1 µg Gesamt-RNA mit der Reversen Transkriptase eines Mäuseleukämievirus in cDNA umgeschrieben. Als Startermolekül für die Reverse Transkriptase diente Oligo-dT. Dieses bindet sich an die Poly-Adenosin-Sequenz, die charakteristisches Merkmal der mRNAs ist. Die errechnete Menge RNA wurde mit 2,5 µl Oligo-dT (Promega, Mannheim) gemischt und mit DEPC-Wasser zu einem Volumen von 12 µl aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 68°C erhitzt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße sofort auf Eis gestellt, um ein Renaturieren der RNA zu verhindern. Nach der Zugabe von je 13 µl des Mastermixes (Promega, Mannheim) wurde die cDNA-Synthese in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 90 Minuten bei 45°C und für 30 Minuten bei 52°C durchgeführt. Die Synthese wurde durch 15-minütiges Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 100°C gestoppt.

<u>RT-Mastermix</u>	5 µl	M-MLV5-Puffer
(Mengenangabe	5 µl	NTP
pro Probe)	2,5 µl	DEPC-Wasser
	0,5 µl	Reverse Transkriptase

### 2.4.2 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der PCR als ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation beliebiger Nukleinsäuren macht sich die Eigenschaft von DNA-Polymerasen zunutze, DNA zu duplizieren. Voraussetzung für diesen Prozess ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, das dann entsprechend verlängert werden kann. Mullis et al. (1994) erkannten, dass ein solcher kurzer Abschnitt künstlich geschaffen werden kann, indem man dem Reaktionsansatz DNA-Fragmente von ca. 20 Nukleotiden Länge, auch Primer genannt, hinzufügt (Schema 2.1, Seite

20). Diese binden aufgrund der komplementären Basenpaarung an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang (Annealing) und können nun von der Polymerase verlängert werden (Primerextension). Denaturiert man anschließend die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge, so können neue Primermoleküle anlagern und der Prozess wiederholt sich.

Bei der Durchführung der PCR wurde 1 µl der cDNA in 50 µl des Mastermixes (Gibco BRL, Karlsruhe) pipettiert. Da die DNA zu Beginn noch in recht komplexer, hochmolekularer Struktur vorliegt, wurde für die initiale Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge eine Temperatur von 94°C für 3 Minuten gewählt, um insbesondere auch GC-reiche Sequenzen zu denaturieren. Ab dem zweiten Zyklus wurde die Reaktion mit nachfolgendem Profil durchgeführt, wobei die Zyklenzahl Gen-spezifisch gewählt wurde:

- 94°C, 1 Minute (Denaturierung)
- X °C, 1 Minute 30 Sekunden (Annealing; Temperatur abhängig vom Primer)
- 72°C, 2 Minuten (Primerextension)

Primer	Sequenz	Genbank-Nummer	T (C°)	Zykluszahl
5' VEGF	gtc gga cag cct cac caa aca g	AF 437895	59	35
3' VEGF	cag cct cgg ctt gtc aca			
5' HIF-1α	gct ggc ccc agc cgc tgg ag	XM 007373	57	30
3' HIF-1α	gag tgc agg gtc agc act ac			
5' β-Aktin	tca ccc aca ctg tgc cca tct	X 00351.1	60	30
3' β-Aktin	cag cgg aac cgc tca ttg cca atg g			

**Schema 2.2 Primersequenzen für die qualitative und Real-time-PCR**  
(T = Temperatur)

Die Analyse der PCR-Produkte wurde elektrophoretisch durchgeführt, da die amplifizierte DNA durch ihre Länge charakterisiert ist. Hierfür wurden 2 g Agarose in 100 ml Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gelöst und 2 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) als Färbemittel hinzugefügt. Nach Aushärtung des Gels wurden je 25 µl der Proben in die Taschen pipettiert und, je nach Größe des Fragmentes, für 40-60 Minuten bei 80 Volt (V) aufgetrennt. Anschließend wurden die quantifizierten DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Vor der Durchführung der PCR für die Gene HIF-1 $\alpha$  und VEGF wurde anhand einer  $\beta$ -Aktin-PCR die Qualität der cDNA-Präparation getestet.

<u>PCR-Mastermix</u>	4 µl	NTPs
(Mengenangabe	5 µl	10-fach PCR-Puffer
pro Probe)	1,5 µl	MgCl <sub>2</sub>
	1 µl	5'-Primer
	1 µl	3'-Primer
	35 µl	Wasser
	0,15 µl	Taq-Polymerase
 <u>TAE-Puffer</u>	 242 g	 Tris-Base
(50-fach)	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	EDTA pH 8,0 (0,5 M)
	auf 1 l	mit Aqua bidest. auffüllen

## 2.5 Proteinbestimmung

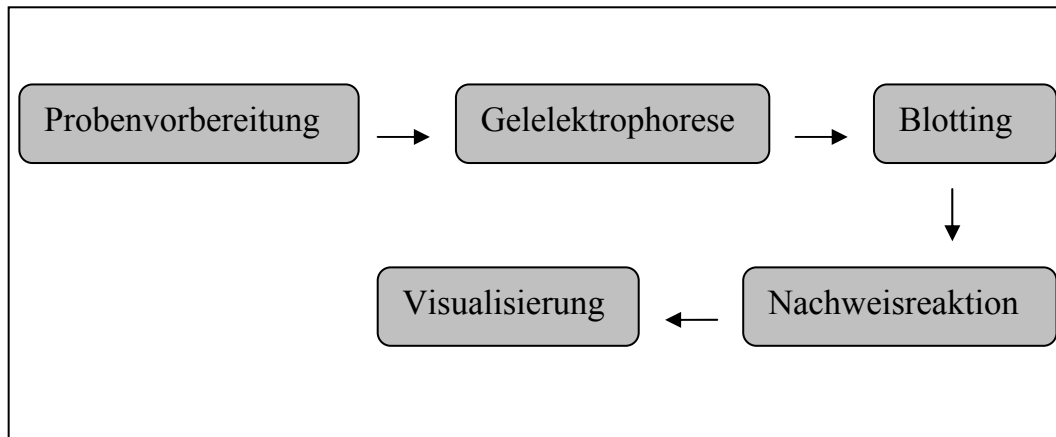
Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) unter Verwendung des Bio-Rad-Kits (Bio-Rad, München). Als Standardlösung diente eine BSA (bovine Serum-Albumin)-Stammlösung, bei der eine Verdünnung bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml durchgeführt wurde.

Die Proben und die Standards wurden 1:10 mit Wasser verdünnt, d.h. zu 5 µl Standard oder Probe wurden 45 µl Wasser gegeben. In jede Vertiefung der 96-iger Mikrotiterplatte wurden 20 µl Proben- oder Standardlösung pipettiert und 10 µl des Bio-Rad Reagenz A sowie 80 µl des Bio-Rad Reagenz B hinzugefügt. Nach leichtem Durchmischen inkubierte der Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 700 \text{ nm}$ , wobei die Konzentration anhand der Standardkurve bestimmt wurde.

### **2.6 Immunoblot (Western Blot) für den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$**

Beim Western Blotting werden Proteine mithilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach ihrer molekularen Masse getrennt und dann auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgt mit spezifischen Antikörpern in einer gekoppelten Reaktion mit sekundären Antikörpern, die zumeist gegen konstante Bereiche des primären Antikörpers gerichtet sind. An diese Antikörper sind Enzyme gekoppelt, durch die Substrate zur Chemilumineszenz angeregt werden (Ramlau, 1987; Kricka, 1993). Die entstehenden Lichtemissionen können dann auf einem Film sichtbar gemacht werden.





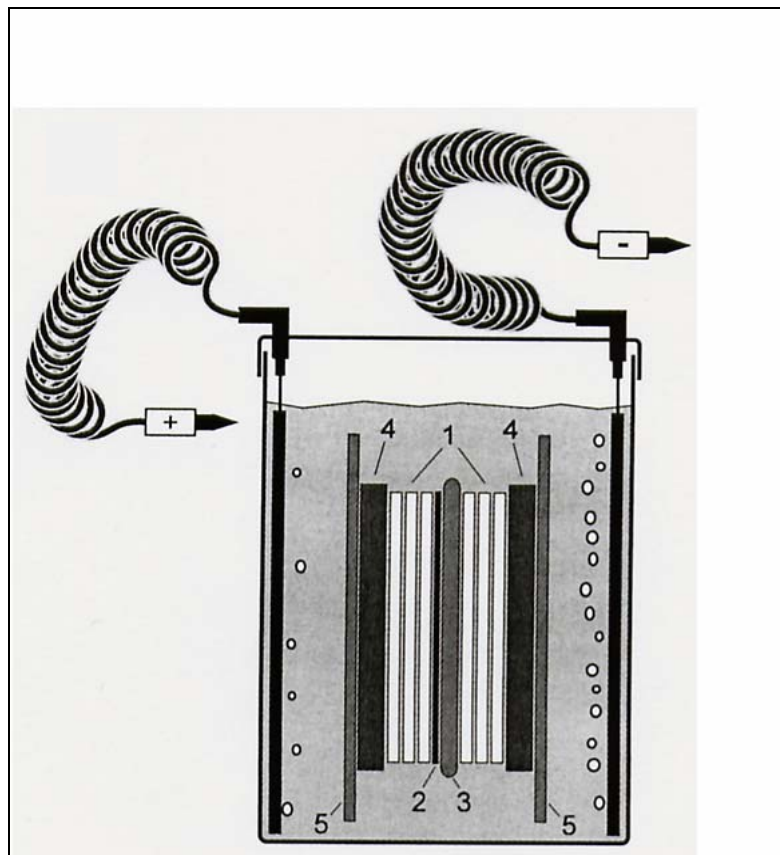
**Schema 2.3 Schematische Darstellung der Abfolge zum Proteinnachweis mit einem Western Blot:** Nach der Vorbereitung der Proben werden jeweils zwischen 30 – 100 µg Protein geladen und für 1 Stunde 20 Minuten bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Naßblot werden sie dann für 1 Stunde 20 Minuten bei 120 V auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran wird durch Färbung mit Ponceau-Rot nachgewiesen. Durch Inkubation mit einem für das Protein spezifischen Antikörper und anschließend mit einem entsprechenden Anti-Immunglobulin, an das ein Enzym gekoppelt ist, werden Substrate zur Chemilumineszenz angeregt. Die Emissionen können dann auf einem Film sichtbar gemacht werden.

Die Ovarialkarzinom-Zellen wurden nach Ende des Versuches und nachdem das Zellkulturmedium abgenommen war, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit 100 µl RNA-Lysepuffer inkubiert und mit einem Schaber abgekratzt. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurde die Probe für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Für die Proteinbestimmung wurden vom Überstand 5 µl in ein separates Reaktionsgefäß gegeben.

Das HIF-1 $\alpha$ -Protein wurde in Gesamtzelllysaten der OVCAR-3- und HTB-77-Zellen nachgewiesen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch in einem SDS-PAGE-Gel (Trenngel 7,5 %, Sammelgel 5 %; Laemmli et al., 1970). Es wurde zwischen 30 - 100 µg Protein geladen und als Molekulargewichtsstandard ein

Proteinmarker eingesetzt. Die Elektrophorese wurde mit 120 V für 1 Stunde 20 Minuten durchgeführt.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Naßblot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, das heißt, das Gel wurde auf die Folie gelegt und dieses „Sandwich“ über drei mit Puffer angefeuchtete Filterpapiere zwischen die Elektroden gelegt. Anschließend wurde der Proteinblot 1 Stunde 20 Minuten bei 120 V durchgeführt.



**Abbildung 2.4 Aufbau eines Elektrobloths:** Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden mittels Naßblot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Gel (3) wurde auf die Membran (2) gelegt und zu beiden Seiten von 3 mit Blotpuffer angefeuchteten Filterpapieren (1) begrenzt. Als Abschluss zum Kunststoffgitter (5) diente jeweils 1 Schwammtuch (4). Aufgrund des schichtartigen Aufbaus bezeichnet man diese Anordnung auch als Sandwich.

Nach: Schrimpf (2002)

Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch Färbung der Membran mit Ponceau-Rot nachgewiesen. Anschließend wurden die Membranen mit 5 %-igem Magermilchpulver (2,5 g auf 50 ml TBS-T) über Nacht geblockt. Die Detektion von HIF-1 $\alpha$  erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (Transduction Laboratories, Heidelberg), mit dem die Membran in einer Verdünnung von 1:250 für 2 Stunden inkubiert wurde. Im Anschluss daran wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, bevor der zweite Antikörper (Anti-Mouse) mit einer Verdünnung von 1:10000 für 1 Stunde auf die Membran gegeben wurde. An den zweiten Antikörper war das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, das luminogene Substrate zur Chemilumineszenz anregen kann.

Nach 5-maligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 Minute in einer Detektionslösung inkubiert. Unmittelbar im Anschluss daran wurde die Membran für 5-10 Minuten auf einem Röntgenfilm exponiert, wo die Orte der immunreaktiven Proteine sichtbar gemacht wurden.

<u>Blotpuffer</u>	3,0 g	Tris-Base
(1-fach)	14,4 g	Glycin
	200 ml	Methanol
	auf 1 l	mit Aqua bidest. auffüllen

<u>Laufpuffer SDS-</u>	15 g	Tris-Base
<u>PAGE</u>	72 g	Glycin
(5-fach)	5 g	SDS
	in 1 l	Aqua bidest. lösen

<u>Lysispuffer</u>	1 ml	Tris pH 7,9 (1M)
(für 100 ml)	0,1 ml	NP-40 (Igepal)
	0,1 ml	EDTA (1 M)

(Fortsetzung)

	30 ml	NaCl (1M)
	auf 100 ml	mit Aqua bidest. auffüllen

Zu 2ml Lysispuffer müssen 200 µl Protease-Inhibitor frisch dazugegeben werden.

<u>Ponceau-Färbelösung</u>	0,2 %	Ponceau S
	3 %	Essigsäure

<u>Sammelgel</u>	3 ml	Acryl-/Bisacrylamid
	37,5 ml	Tris/HCl pH 6.8 (1 M)
	0,1 ml	SDS
	100 µg	APS
	100 µg	TEMED
	auf 100 ml	mit Aqua bidest. auffüllen

<u>4* SDS-Sample</u>	0,4 ml	Aqua bidest.
<u>Puffer</u>	1,6 ml	Tris pH 6,8 (0,5 M)
	3,2 ml	10 % SDS
	0,8 ml	β-Mercaptoethanol
	0,4 ml	0,5 % Bromphenol-Blau
	1,6 ml	10 % Glycerin

<u>TBS-Puffer</u>	24,2 g	Tris-Base
(10-fach)	80 g	NaCl
	in 800 ml	Aqua bidest. lösen
	pH 7,6	mit 32 % HCl einstellen
	auf 1 l	mit Aqua bidest. auffüllen

<u>TBS-T</u>	50 ml auf 500 ml 250 µl	TBS-Puffer mit Aqua bidest. auffüllen Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate
<u>Trenngel</u> (für 100 ml)	10 ml 37,7 ml 0,1 ml 100 µg 100 µg	Acryl-/Bisacrylamid Tris/HCl pH 8,8 (1 M) SDS APS TEMED
<u>Tris HCl pH 6,8,</u> <u>0,5 M</u>	30,3 g in 500 ml	Tris-Base Aqua bidest. lösen pH mit konzentrierter HCl einstellen
<u>Tris HCl pH 8,8,</u> <u>1,5 M</u>	90,85 g in 450 ml	Tris-Base Aqua bidest. lösen pH mit konzentrierter HCl einstellen
<u>Western Blot</u> <u>Detektionslösung</u>	10 ml 3 µl 50 µl 25 µl	Tris/Cl pH 8,5 (100 mM) 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Luminol (0,25 M) P-Kumarinsäure (90 mM)

### 2.7 Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) für VEGF

Der Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) dient der Bestimmung der Proteinmenge (in diesem Fall VEGF) im Zellüberstand. Er beruht auf dem Prinzip der enzymatisch-katalysierten Chromogenumwandlung, die mit einem ELISA-Reader erfasst werden kann. Als Enzym wurde die Peroxidase benutzt.

Eine Mikrotiterplatte wurde über Nacht mit einem VEGF-spezifischen, monoklonalen Antikörper beschichtet (sogenannter Capture-Antibody; 0,4 µg/ml; R&D-Systems, USA). Standard und Proben wurden in die Vertiefungen pipettiert und die VEGF-Moleküle banden an den immobilisierten Antikörper. Nachdem die ungebundenen Substanzen mit Puffer abgewaschen worden waren, wurde ein VEGF-spezifischer enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper (biotinylierter Detection-Antibody; R&D-Systems, USA) in die Vertiefungen gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift, der das ungebundene Antikörper-Enzym-Reagenz entfernt hat, wurde eine Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert. Es entwickelte sich sodann eine Farbreaktion in Proportion zu der Menge an VEGF, die während des ersten Schrittes gebunden hatte. Die Farbentwicklung wurde mittels einer Lösung aus 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Farbintensität gemessen.

<u>Blockierungspuffer</u>	1 %	BSA in PBS
<u>PBS (pH 7,4)</u>	1 l	Aqua bidest.
	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,44 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O

<u>TBS (pH 7,3)</u>	1 l	Aqua bidest.
	1 g	Bovines Serum Albumin
	2,42 g	Tris-Base
	4,38 g	NaCl
<u>Waschpuffer</u>	0,05 %	Tween 20 in PBS, pH 7,4

## 2.8 Präparation von Proteinkernextrakten

Voraussetzung für die Analyse von Protein-DNA-Komplexen ist die Präparation von Proteinextrakten. Die hier angewandte Präparation nach Schreiber et al. (1989) basiert auf der von Dignam et al. (1983) beschriebenen Methode. Zunächst wurden die Zellkerne isoliert, dann die Kernproteine mit einer hohen Salzkonzentration aus den Kernen extrahiert. Anschließend wurden die Proben dialysiert, um die Salzkonzentration des Proteinextraktes herabzusetzen.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden bei einer Zelldichte von 70 - 80 % geerntet und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 150 µl Puffer A pro 10 cm Platte wurden die Zellen mit einem Schaber abgekratzt. Sodann wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Daran anschließend wurden die Zelllysate bei 5000 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, die zytoplasmatische Fraktion, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 80 µl Puffer B resuspendierten die im ersten Reaktionsgefäß verbliebenen Präzipitate, die dann durch die 30-minütige Anwendung eines Magnetrührers homogenisiert wurden. Nach der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand erneut abgenommen (Kernfraktion) und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Vom Überstand wurden 5 µl für die Proteinbestimmung abgenommen. Dann wurde die Kernfraktion bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

<u>Puffer A</u>	0,5 ml	HEPES pH 7,9 (10 mM)
	75 µl	MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)
	0,5 ml	KCl (10 mM)
	25 µl	PMSF (0,5 mM)
	25 µl	DTT (0,5 mM)
 <u>Puffer B</u>	1 ml	HEPES pH 7,9 (20 mM)
	21,7 ml	NaCl (0,42 M)
	75 µl	MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM)
	20 µl	EDTA (0,2 mM)
	25 µl	PMSF(0,5 mM)
	25 µl	DTT (0,5 mM)

### **2.9 Elektrophoretic-mobility-shift-assay (EMSA) zum Nachweis der DNA-Bindung von HIF-1**

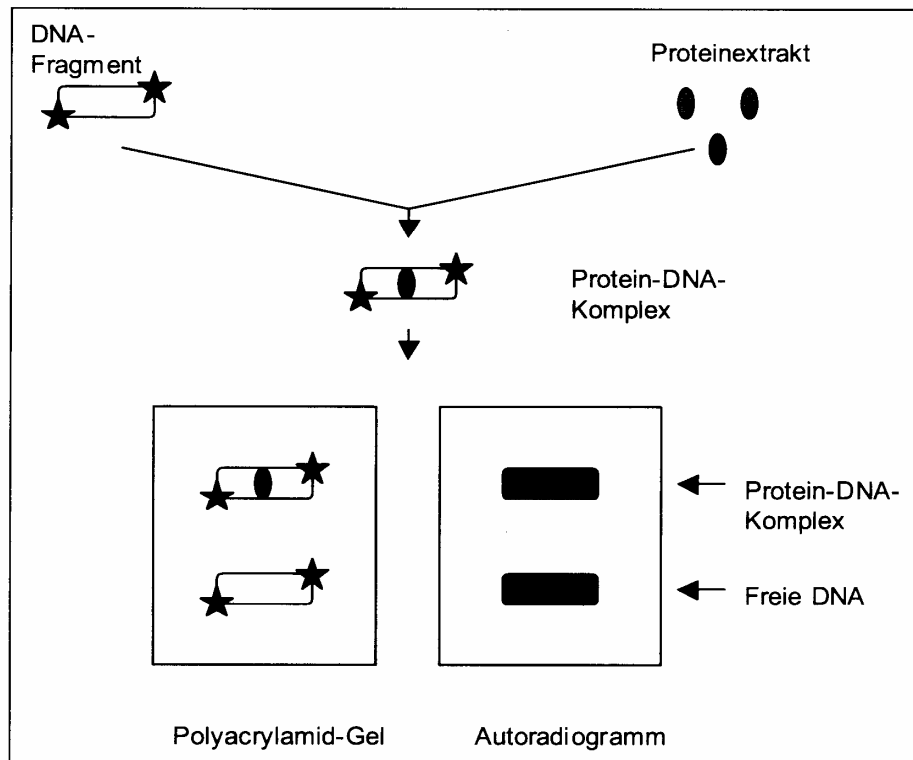
Der Elektrophoretic-mobility-shift-assay (EMSA) ist eine Methode für den Nachweis und die Charakterisierung von Protein-DNA-Wechselwirkungen. Der größte Anwendungsbereich umfasst die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren (Mitchell et al., 1989) und der DNA-Elemente, an die sie binden (Promotoren, Enhancer, Silencer).

Das Prinzip des EMSA beruht darauf, daß Protein-DNA-Komplexe während einer elektrophoretischen Auftrennung langsamer laufen als freie DNA. Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment wird mit Proteinextrakten inkubiert. Die gegebenenfalls entstandenen Protein-DNA-Komplexe werden anschließend in einem Polyacrylamid-gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Bei Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes tritt neben dem Signal des nicht komplexierten DNA-Fragmentes eine zusätzliche Bande mit deutlich verändertem



Laufverhalten auf („Bandshift“; Lane et al., 1992). Durch Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen das vermutete Protein, das an die DNA bindet, kann die Identität des DNA-bindenden Proteins festgestellt werden. Dabei entsteht ein nochmals langsamer laufender Komplex, der als Supershift bezeichnet wird.

Die Identifizierung sequenzspezifischer DNA-bindender Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, erfordert Fragmentlängen der DNA-Probe von 20 - 35 Basenpaaren, die üblicherweise durch Hybridisierung zweier synthetisch hergestellter komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide gewonnen werden. Zur Vermeidung unspezifischer Proteinbindungen ist es wichtig, dass die verwendeten DNA-Fragmente doppelsträngig und ohne überstehende Enden vorliegen, da an Einzelsträngen oder überstehenden Enden häufig eine unspezifische Bindung erfolgt.



**Abbildung 2.5 Prinzip der Bandshift-Analyse:** Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment wird in einem Proteinextrakt inkubiert und die entstandenen Protein-DNA-Komplexe werden in einem Polyacrylamid-Gel von den nichtgebundenen DNA-Fragmenten getrennt.

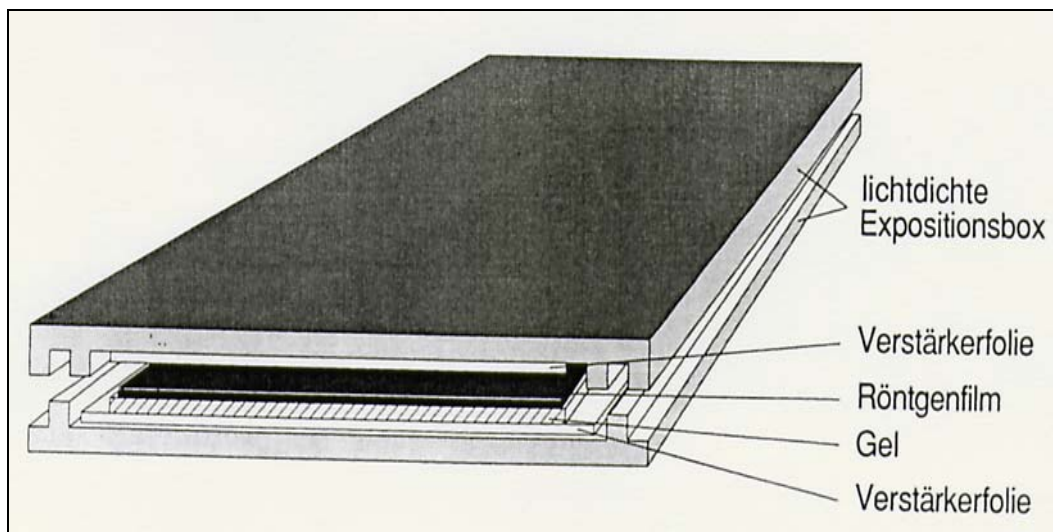
Nach: Gassen und Schrimpf, 1999

Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgt durch 5'-Phosphorylierung von DNA mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Adenosintriphosphat (ATP). Dabei wird in einer durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion die  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligodesoxynukleotids übertragen.

Das radioaktive  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP (ICN, Eschwege) sowie die benötigten Oligonukleotide (MWG, Eschwege), die die Sequenz der HIF-1 $\alpha$ -Bindungsstelle aus dem VEGF-Promoter („sense“ 5'-gttggagccc**acgt**atgcactgtg-3', „antisense“ 5'-cacagtgcata**acgt**gggctccaac-3') enthalten, wurden reaktionsbereit erworben.

Die Oligonukleotide wurden mit dem  $^{32}\text{P}$ -ATP gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die radioaktiv-markierten Oligonukleotide durch Gelpermeationschromatographie in Bio-Gel G-30-Säulen von den freien Desoxyribonukleotiden getrennt. Die Annealing-Reaktion der beiden DNA-Stränge (radioaktiver Sense- und nicht radioaktiver Antisense-Strang) erfolgte bei dem im Überschuss vorhandenen unmarkierten „Antisense“-Oligonukleotid.

Für die eigentliche Protein-DNA-Bindungsreaktion wurden 10  $\mu\text{g}$  der Kernextrakte für 20 Minuten auf Eis in einem Bindungspuffer mit 100 ng Thymus-DNA vorinkubiert. Das Gesamtvolumen bei der Bindungsreaktion betrug 20  $\mu\text{l}$ . Nach der Zugabe der frischen  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Probe erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Für die Ausbildung eines Supershiftes wurde der Ansatz zusätzlich mit einem Anti-HIF-1 $\alpha$ -Antikörper (Transduction Laboratories, Heidelberg) für 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden nach einer Vorlaufzeit von 30 Minuten bei 100 V auf ein 5 %-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach 4-stündiger Laufzeit bei 160 V wurde das Gel getrocknet und über Nacht auf einem Kodak X-Omat-Film bei -70°C exponiert.



**Abbildung 2.6 Darstellung der Autoradiographie mit einer Verstärkerfolie:** Das in einer Haushaltsfolie gelegene Gel wird in einer mit Schaumgummi ausgefüllten lichtundurchlässigen Box positioniert. Nacheinander werden nun zuerst der Röntgenfilm und dann eine Verstärkerfolie auf das Gel gelegt.

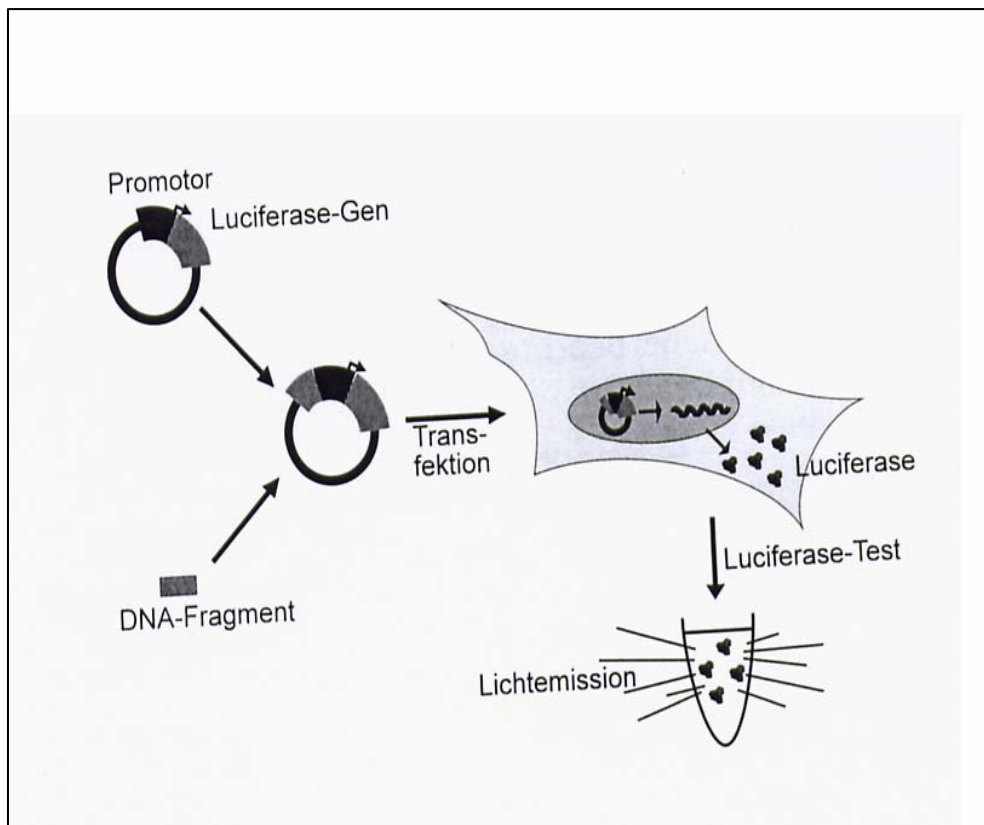
Nach: Schrimpf (2002)

<u>Bindungspuffer</u>	0,4 ml	Tris/HCl pH 7,9 (1M)
(für 100 ml)	6 ml	KCl (1 M)
	0,1 ml	EDTA (1 M)
	0,1 ml	DTT (1 M)
	1,2 ml	HEPES NaOH pH 7,9 (1 M)
	Auf 100 ml	mit Aqua bidest. auffüllen
<u>5 %-iges Gel</u>	7,15 ml	Polyacrylamid/Bisacrylamid
	5,5 ml	10-fach TBE
	41,75 ml	Aqua bidest.
	550 µl	APS
	55 µl	TEMED

<u>Laufpuffer</u>	108 g	Tris-Base
(10-fach TBE-Puffer)	55 g	Borsäure
	40 ml	EDTA, pH 8,0 (0,5 M)
	auf 1 l	mit Aqua bidest. auffüllen
<u>TE-Puffer pH 7,5</u>	1 ml	Tris/HCl pH 7,5 (1 M)
	0,1 ml	EDTA (1 M)
	Auf 100 ml	mit Aqua bidest. auffüllen

### 2.10 Reportergenassay

Reportergene werden als Indikatoren für die Transkriptionsaktivität von regulatorischen DNA-Elementen in Zellen genutzt. Dazu wird das zu untersuchende DNA-Element in einem Expressionsvektor kloniert, in dem die Expression eines Reportergens durch die Transaktivität des DNA-Elements gesteuert wird. Mit dem Vektor werden Zellen transient transfiziert und unter entsprechenden Versuchsbedingungen stimuliert. Am Ende des Versuches wird das Produkt des Reportergens, häufig ein Enzym, isoliert und seine Aktivität gemessen. Nach Zugabe des Substrats und anschließender Messung der enzymatischen Aktivität des Reporterproteins ist eine indirekte Bestimmung der Transkription des Reportergens möglich.

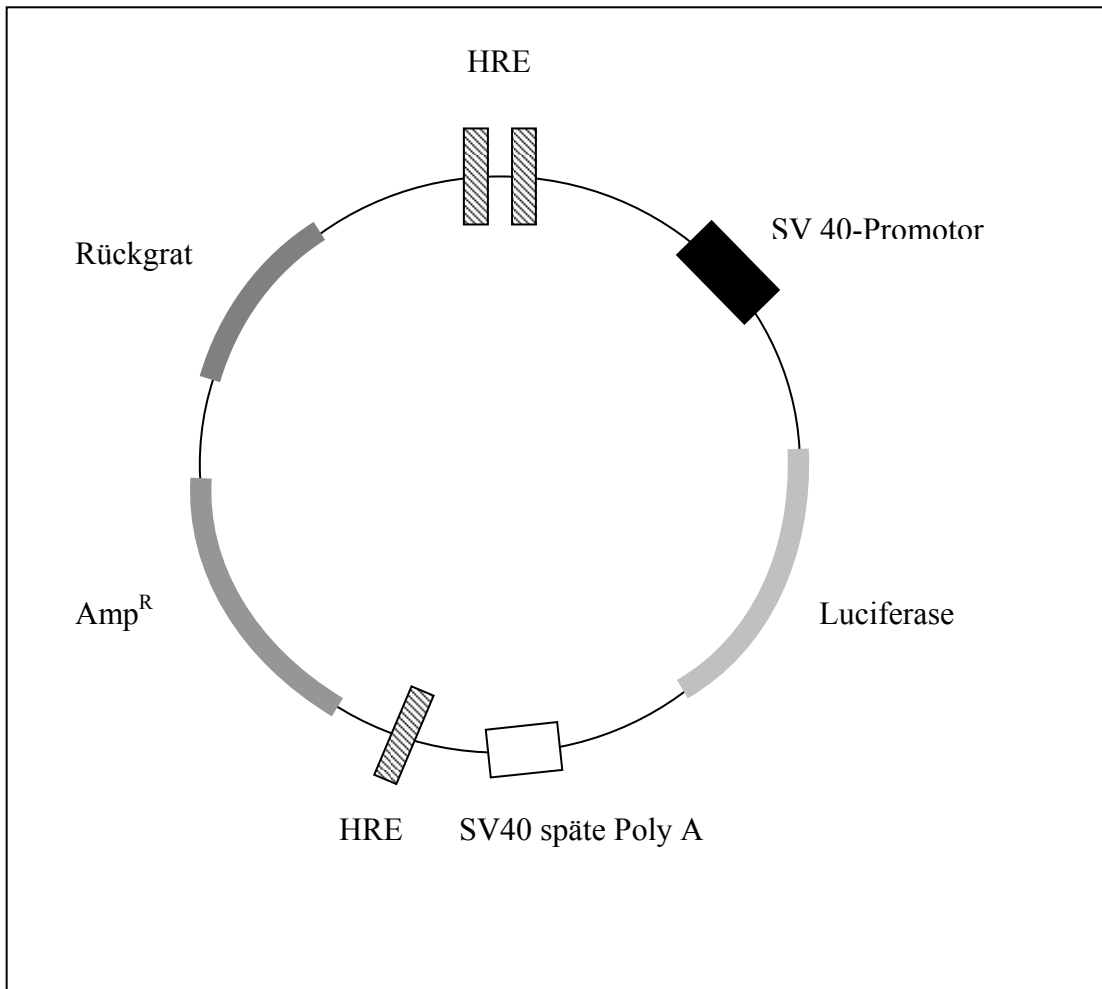


**Abbildung 2.7 Prinzip des Reporterassays:** Das zu untersuchende DNA-Fragment wird in ein Testplasmid inseriert, das resultierende Plasmid in die Ovarial-Karzinom-Zellen transfiziert und die Expression des Reportergens Luciferase durch den entsprechenden enzymatischen Test quantifiziert.

Nach: Schrimpf (2002)

### 2.10.1 Reporterassay mit dem Vektor pH3SVL

Das Reportergenplasmid pH3SVL wurde freundlicherweise von Prof. R. Wenger, Leipzig, zur Verfügung gestellt. Der Vektor besitzt im Promotorbereich drei HIF-response elements (HRE) und verfügt ferner über eine Sequenz, die ihm Resistenz gegen bestimmte Antibiotika verleiht.



**Schema 2.8 Schematische Darstellung des Vektors pH3SVL:** Der Vektor pH3SVL besitzt drei HIF-response elements (HRE), die es ihm ermöglichen, sechs HIF-Proteine zu binden. Durch die Sequenz Amp<sup>R</sup> weist er eine Resistenz gegen Ampicillin auf, was bei der Anzuchtung ausgenutzt wird. Als Reportergen hat er das Enzym Luciferase, dessen katalytische Aktivität beim Reportgenassay entscheidend ist.

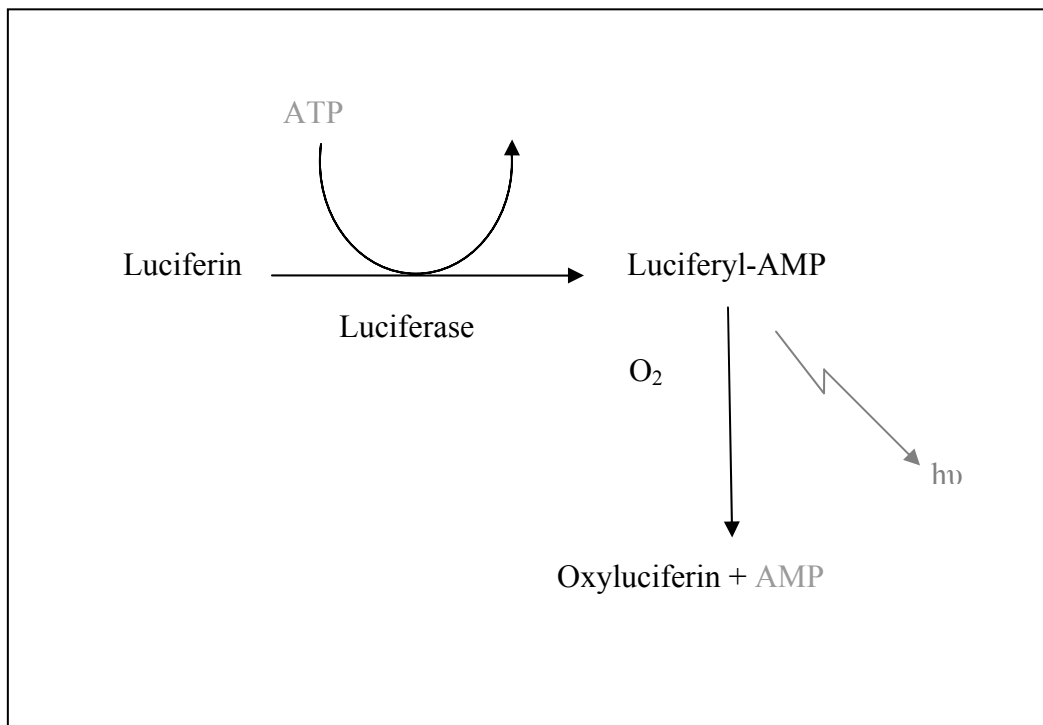
Als Reportergen wurde das rekombinante Gen des Enzyms Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photilus pyralis* (de Wet et al., 1986) verwendet, da die auf die Oxidation des Käfer-Luciferins zurückzuführende Biolumineszenzreaktion gut nachgewiesen werden kann.

Den Transfer des Vektors in die humanen Zellen kann man durch verschiedene Methoden erreichen wie z.B. Elektroporation, Calciumphosphat oder durch Liposom-vermittelte Transfektion. Bei der Liposom-vermittelten Transfektion wird ein sogenanntes Tfx-Reagenz verwendet, das eine Mischung aus L-Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin (DOPE) und einem synthetischen, kationischen Lipidmolekül ist (N, N, N', N'-tetramethyl-N, N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-di(oleoyloxy)-1,4-butanediammonium Iodid). Sobald das Tfx-Reagenz mit Wasser hydratisiert ist, bildet es multilamelläre Vesikel, die mit den Nukleinsäuren interagieren. Die Vesikel fusionieren mit der Zellmembran und erleichtern so den Transfer der Nukleinsäuren in die Zelle.

Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von ca. 50 % gezüchtet. Es wurde 0,75 µg des Plasmids mit 3,37 µl Tfx-20-Reagenz in 200 µl serumfreiem Medium gemischt, für 15 Minuten vorinkubiert und dann in je eine Vertiefung einer 24-well-Platte pipettiert. Nach einer Transfektionszeit von 4 Stunden wurden je Vertiefung 800 µl serumhaltiges Medium hinzugefügt und anschließend die Zellen in den Versuch genommen.

Nach Beendigung des jeweiligen Experiments wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden je Vertiefung 50 µl Reporter-gen-Lysis-Puffer hinzugegeben und die Platten für 10 Minuten auf einen Schüttler gestellt. Für die Messung wurden 80 µl des Luciferase-Substrats in einem Meßröhrchen vorgelegt und 20 µl Zellextrakt hinzugefügt. Nach Zugabe von Luciferin startete sofort die lichtemittierende Reaktion. In der ATP- und Mg-abhängigen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP-Zwischenstufe gebildet, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert wird. Bei dieser Reaktion wird ein Photon emittiert. Die Luciferase-Aktivität wird in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.



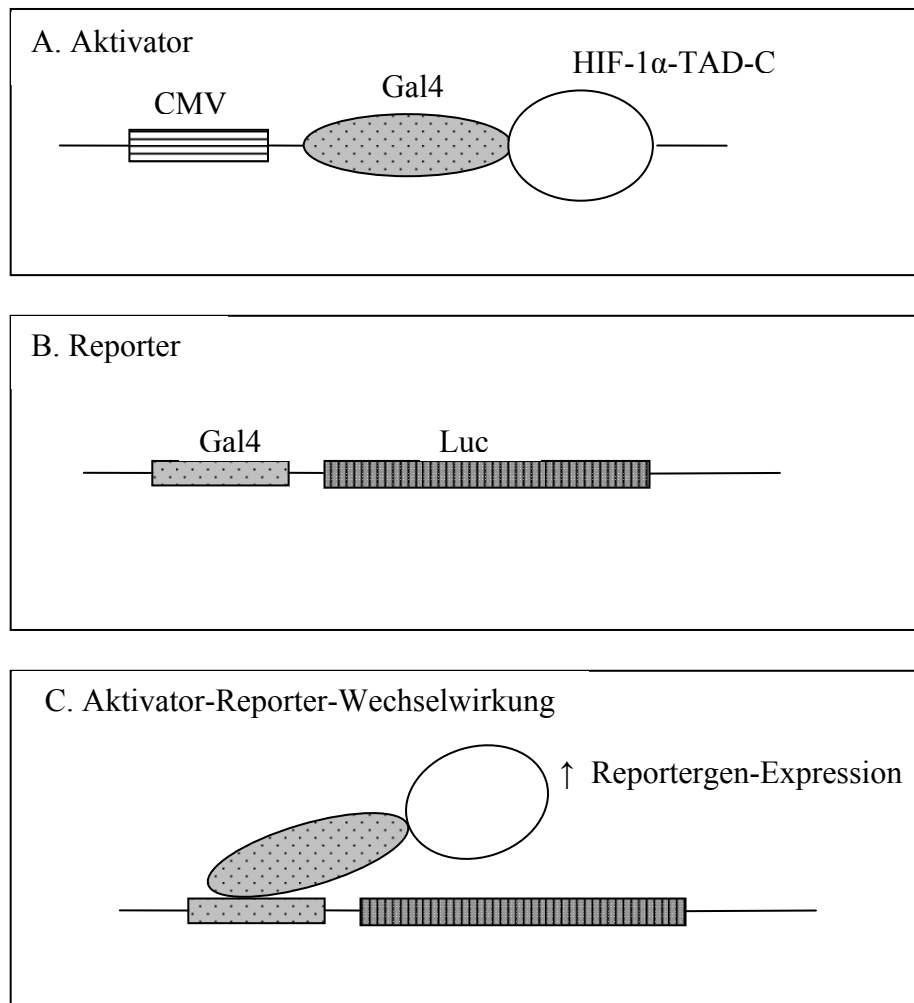


**Schema 2.9 Schematische Darstellung der Luciferase-katalysierten Reaktion:** In einer ATP- und Mg-abhängigen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP-Zwischenstufe aus dem Luciferin gebildet. In Gegenwart von Sauerstoff kommt es zur Oxidation des Luciferyl-AMPs zu Oxyluciferin, wobei ein Photon emittiert wird.

### 2.10.2 Reportergenassay mit dem Gal4-Hybridsystem

Das Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TAD-C-Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. P. Ratcliffe, Oxford, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein chimeres Aktivator/Reporter-System, bei dem die C-terminale Transaktivierungsdomäne von HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ -TAD-C) mit dem verkürzten Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe fusioniert wird. Die konstitutive Expression des Fusionsproteins wird durch einen Cytomegalievirus (CMV)-Promoter sichergestellt. Das in diesem System als Reporter genutzte Gal4-Luciferase-Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. L. Poellinger, Stockholm, zur Verfügung gestellt. Das Gal4-HIF-1-Fusionsprotein stimuliert die Aktivität des Reportergens nur dann, wenn die TAD-C des HIF-1 $\alpha$  aktiviert worden ist.

Der Versuch wurde analog dem unter 2.10.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Nach dem Anzüchten der Zellen wurden diese mit einem Medium versetzt, das mit 0,5 µg des Gal4-HIF-1α-TAD-C-Plasmids und 0,5 µg des Gal4-Luciferase-Plasmids (pro Vertiefung) und Tfx-20-Reagenz gemischt worden war.



**Schema 2.10 Schematische Darstellung des GAL4-HIF-1α-TAD-C-Plasmids:**

- Das Aktivator-Plasmid enthält die Gal4-DNA-bindende Domäne sowie die HIF-1α-TAD-C. Die fortwährende Expression des Fusionsproteins wird durch einen CMV-Promoter sichergestellt.
- Im Reporterplasmid wird die Expression des Luciferase-Gens durch Gal4 kontrolliert.
- Interaktion des Aktivatorproduktes mit dem Reporterplasmid, wenn HIF-1α-TAD-C aktiv ist.

### **2.11 Statistik**

Die Statistik wurde mithilfe des InStat 3.0 der Firma GraphPad Software berechnet.

Die Ergebnisse wurden ab  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

\* =  $< 0,05$

Die Grafikbearbeitung erfolgte mithilfe des ACD FotoCanvas 3.0 der Firma ACD Systems.

### 3. Ergebnisse

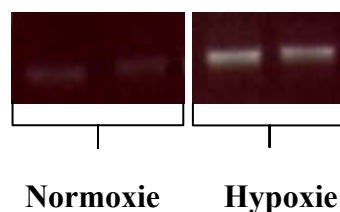
#### 3.1 Untersuchungen zur Regulation von HIF-1

##### 3.1.1 Hypoxie als Stimulus für die Bildung der HIF-1 $\alpha$ -mRNA

Eine mangelhafte Sauerstoffversorgung von Gewebe fördert die Expression des Gens HIF-1 $\alpha$  (Nakayama et al., 2001). Anhand der PCR wurde untersucht, ob in den Ovarialkarzinom-Zelllinien HTB-77 und OVCAR-3 die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression ebenfalls durch Hypoxie stimuliert wird.

Die bei 21 % Sauerstoff gezüchteten Zellen wurden für 3 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 3 % oder 21 % ausgesetzt. Nach Durchführung von RNA-Präparation und RT erfolgte die PCR für die HIF-1 $\alpha$ -cDNA.

##### HTB-77



**Abb. 3.1 Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression in HTB-77-Zellen unter reduziertem Sauerstoffangebot:** Die Proben wurden 3 Stunden in Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Nach der Isolation der Gesamt-DNA wurde die RT-PCR durchgeführt.

n = 5

Es konnte eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression bei den Zellen festgestellt werden, die einem reduzierten Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt waren.

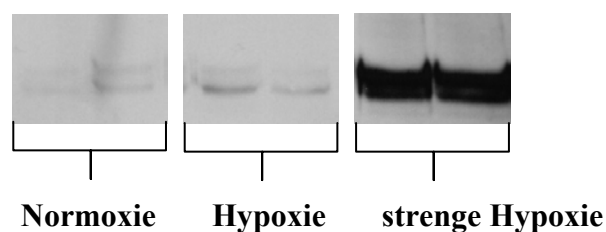
Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die Ovarialkarzinom-Zellen auf eine Sauerstoffunterversorgung mit einer Induktion der HIF-1 $\alpha$ -mRNA reagieren.

### 3.1.2 Hypoxie als Stimulus für die Akkumulation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins

Durch Hypoxie kommt es zu einer vermehrten Expression des HIF-1 $\alpha$ -Gens in Ovarialkarzinom-Zellen. Der Western Blot ermöglicht es, in Erfahrung zu bringen, ob unter hypoxischen Bedingungen auch eine Steigerung der Proteinmenge zu verzeichnen ist.

Die Zellen wurden für 6 Stunden unter Normoxie (21 % Sauerstoff), Hypoxie (3 % Sauerstoff) oder strenger Hypoxie (< 1 % Sauerstoff) inkubiert. Nach der Probenaufbereitung wurden jeweils 50  $\mu$ g Protein geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die Proteine im eigentlichen Blot-Vorgang nachgewiesen und die entstehenden Lichtemissionen durch 5-minütige Inkubation der Membran auf dem Film sichtbar gemacht.

#### HTB-77



**Abb. 3.2 Darstellung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins im Western Blot mit Extrakten von HTB-77-Zellen:** Nach einer Inkubation von 6 Stunden unter normoxischen (21 % Sauerstoff), hypoxischen (3 % Sauerstoff) und streng hypoxischen (< 1 % Sauerstoff) Bedingungen wurden je 50  $\mu$ g Protein geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem anschließenden Blot-Vorgang wurden die entstehenden Lichtemissionen durch 5-minütige Inkubation der Membran auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

n = 3

Im Western Blot konnte eine Zunahme der Proteinmenge mit abnehmendem Sauerstoffpartialdruck festgestellt werden.

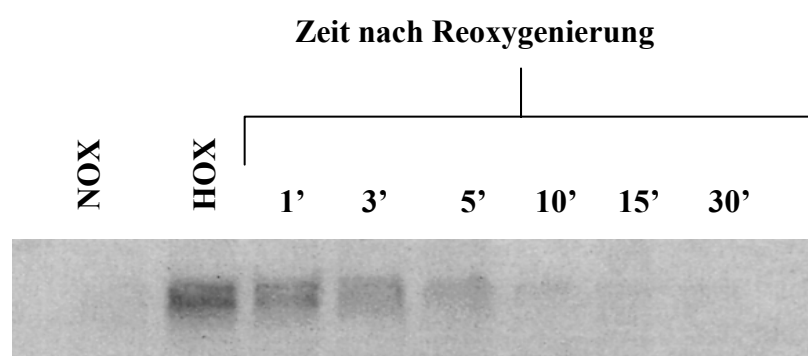
Unter Hypoxie kommt es demnach sowohl zu einer Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression als auch zu einer Vermehrung der Proteinmenge.

### 3.1.3 Bestimmung der Stabilität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins

Um Hinweise über die Dynamik der HIF-1 $\alpha$ -Proteinstabilität zu gewinnen, wurde untersucht, wie lange das HIF-1 $\alpha$ -Protein nach Reoxygenierung nachweisbar ist.

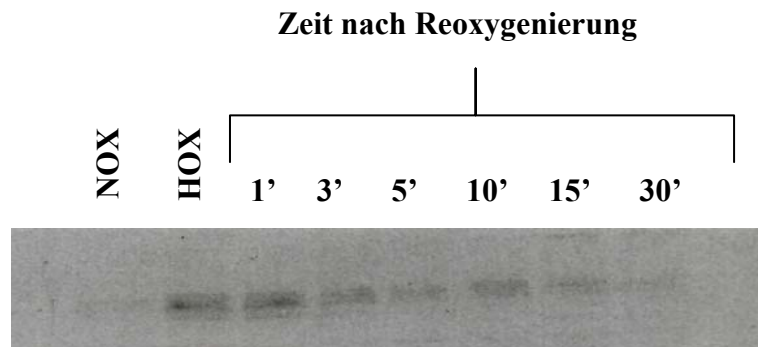
Die Zellen wurden für 4 Stunden normoxischen (21 % Sauerstoff) oder hypoxischen (3 % Sauerstoff) Bedingungen ausgesetzt. Die der Hypoxie ausgesetzten Zellen wurden im Anschluss daran für einen Zeitraum von 0, 1, 3, 5, 10, 15 oder 30 Minuten unter einer Sauerstoffkonzentration von 21 % reoxygeniert. Anhand des Western Blots wurde untersucht, für welchen Zeitraum das HIF-1 $\alpha$ -Protein nach Reoxygenierung nachzuweisen ist.

#### HTB-77



**Abb. 3.3 Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Proteins in HTB-77-Zellen nach Reoxygenierung:** Die Zellen wurden für 4 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 3 % ausgesetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Reoxygenierung unter 21 % Sauerstoff für 0 bis 30 Minuten.

n = 3

**OVCAR-3**

**Abb. 3.4 Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Proteins in OVCAR-3-Zellen nach Reoxygenierung:** Analog wie unter Abb. 3.3 beschrieben, wurde bei den OVCAR-3-Zellen vorgegangen.  
n = 3

Die Versuchsreihen zeigten Unterschiede in der Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Proteins bei den betrachteten Zelllinien: bei den HTB-77-Zellen ließ sich das durch Inkubation in Hypoxie stabilisierte HIF-1 $\alpha$ -Protein nur wenige Minuten nach Reoxygenierung nachweisen. Im Vergleich dazu waren bei den hypoxischen OVCAR-3-Zellen noch länger nach der Exposition unter 21 % Sauerstoff Spuren des HIF-1 $\alpha$ -Proteins sichtbar. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Dichte der Zellen zurückzuführen: die OVCAR-3-Zellen sind zumeist dichter gewachsen als die HTB-77-Zellen, so dass sie dadurch bedingt einem niedrigeren Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt waren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Proteinmenge von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie gesteigert wird. Die Stabilität des Proteins beträgt wenige Minuten.

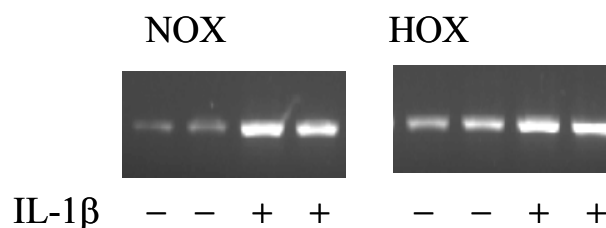
### 3.1.4 Untersuchungen über den Einfluss des Zytokins Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) auf die HIF-1 $\alpha$ -Genexpression

Inflammatorische Zytokine sind biologisch aktive Mediatoren, meist Proteine, die für die interzelluläre Kommunikation im Rahmen einer Entzündungsreaktion wichtig sind. Sie besitzen meist nur kurze Halbwertszeiten und vermitteln ihre Effekte über membranständige Rezeptoren (Kayser et al., 1997).

Das hier verwendete Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gehört zusammen mit dem Interleukin-6 (IL-6) und dem Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu den Aktivatoren der akuten Entzündungsreaktion.

Die Ovarialkarzinom-Zelllinien wurden mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  versetzt und für 3 Stunden einer normoxischen oder hypoxischen Umgebung ausgesetzt. Anhand der RT-PCR wurde untersucht, wie sich die Anwesenheit von IL-1 $\beta$  auf die HIF-1 $\alpha$ -Genexpression auswirkt.

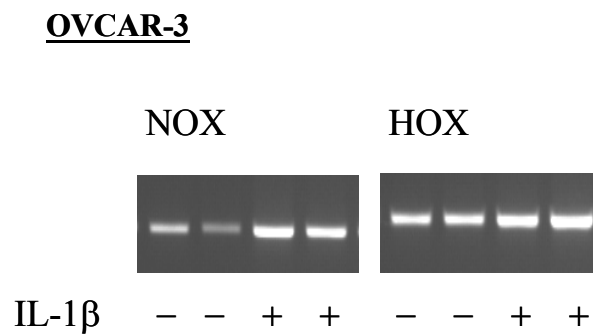
#### HTB-77



**Abb. 3.5 Darstellung der HIF-1 $\alpha$ -cDNA-PCR von mit Zytokinen behandelten HTB-77-Zellen:** Nach 3-stündiger Inkubation der Proben in Normoxie oder Hypoxie kommt es unter verminderten Sauerstoffbedingungen zu einer Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Expression. Das Zytokin IL-1 $\beta$  steigert die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression unter Normoxie.

n = 3





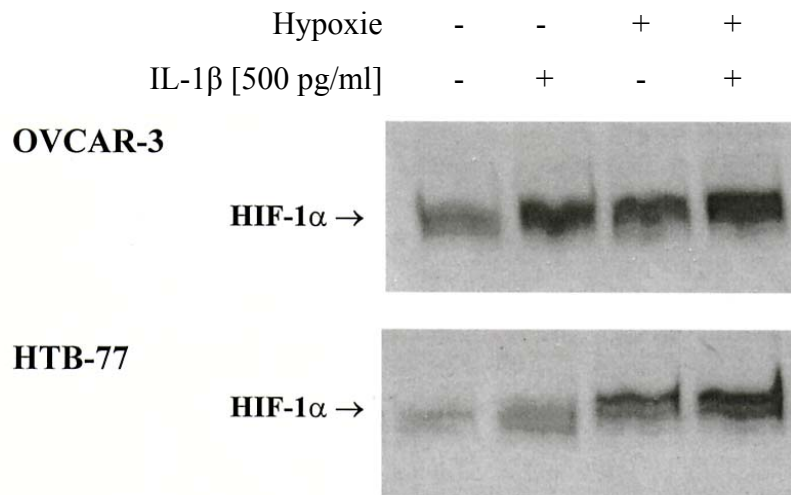
**Abb. 3.6 Darstellung der HIF-1 $\alpha$ -cDNA-PCR von mit Zytokinen behandelten OVCAR-3-Zellen:** Auch bei den OVCAR-3-Zellen steigert das Zytokin IL-1 $\beta$  die HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression unter Normoxie nach 3-stündiger Inkubation.  
n = 3

In der PCR konnte, verglichen mit den unbehandelten Proben, eine gesteigerte Expression des HIF-1 $\alpha$ -Gens unter Normoxie bei den mit IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen beobachtet werden. Ferner zeigt sich auch hier bei den unbehandelten Zellen eine Zunahme der Genexpression unter Hypoxie.

### 3.1.5 Untersuchungen über den Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ auf den HIF-1 $\alpha$ -Proteingehalt

Nachdem in der PCR ein positiver Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$  auf den HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Gehalt in Normoxie festgestellt wurde, sollte anhand des Western Blots überprüft werden, ob die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge durch IL-1 $\beta$  gesteigert wird.

Die mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  versetzten Zellen wurden für 3 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert.



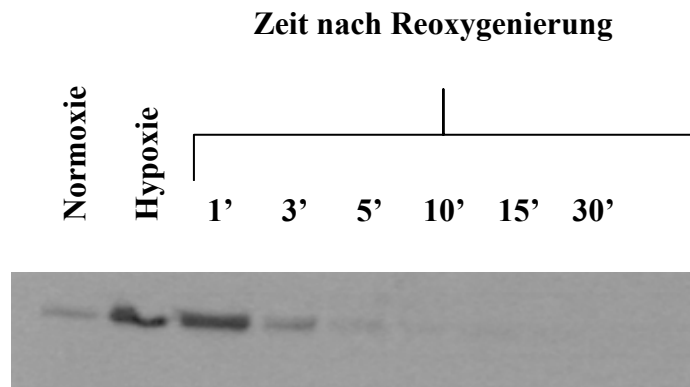
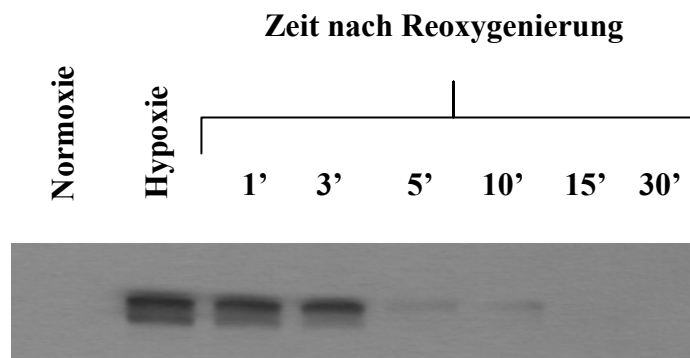
**Abb. 3.7 Darstellung des HIF-1 $\alpha$ -Western Blots von mit IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen:** Die Zellen wurden mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  inkubiert und für 3 Stunden hypoxischen oder normoxischen Bedingungen ausgesetzt. Das Zytokin IL-1 $\beta$  bewirkt eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge unter Normoxie im Vergleich zu den Kontrollen.

n = 3

Im nachfolgenden Western Blot stellte sich eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge bei den Zellen heraus, die mit dem Zytokin behandelt und normoxischen Bedingungen ausgesetzt waren. Dieser Effekt konnte dabei bei beiden Zelllinien festgestellt werden.

### 3.1.6 Bestimmung der Stabilität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins in Anwesenheit des Zytokins IL-1 $\beta$

Analog zu dem unter 3.1.3 gezeigten Versuch sollte die Zeitdauer bestimmt werden, für die das unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$  akkumulierte HIF-1 $\alpha$ -Protein nach Reoxygenierung nachzuweisen ist.

**Unbehandelte HTB-77****Mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  behandelte HTB-77**

**Abbildung 3.8 Stabilisierung des HIF-1 $\alpha$ -Proteins durch IL-1 $\beta$ :** Die Zellen wurden mit IL-1 $\beta$  behandelt und für 4 Stunden unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Reoxygenierung in Normoxie für 0, 1, 3, 5, 10, 15 oder 30 Minuten. Es zeigte sich, dass bei den mit IL-1 $\beta$  [500 pg/ml] versetzten Zellen die Degradation des HIF-1 $\alpha$ -Proteins verzögert ist.

n = 3

Im darauf folgend durchgeführten Western Blot zeigte sich eine im Vergleich zu den Kontrollproben verlängerte Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Proteins bei den mit IL-1 $\beta$  behandelten Zellen.

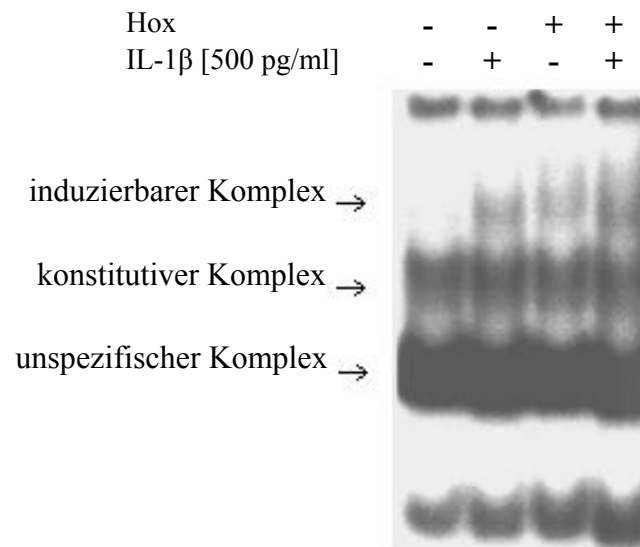
Zusammenfassend gesagt, wird durch das Zytokin IL-1 $\beta$ :

1. die Expression des Gens HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie gesteigert,
2. die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge unter Normoxie vermehrt,
3. die Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Proteins verlängert.

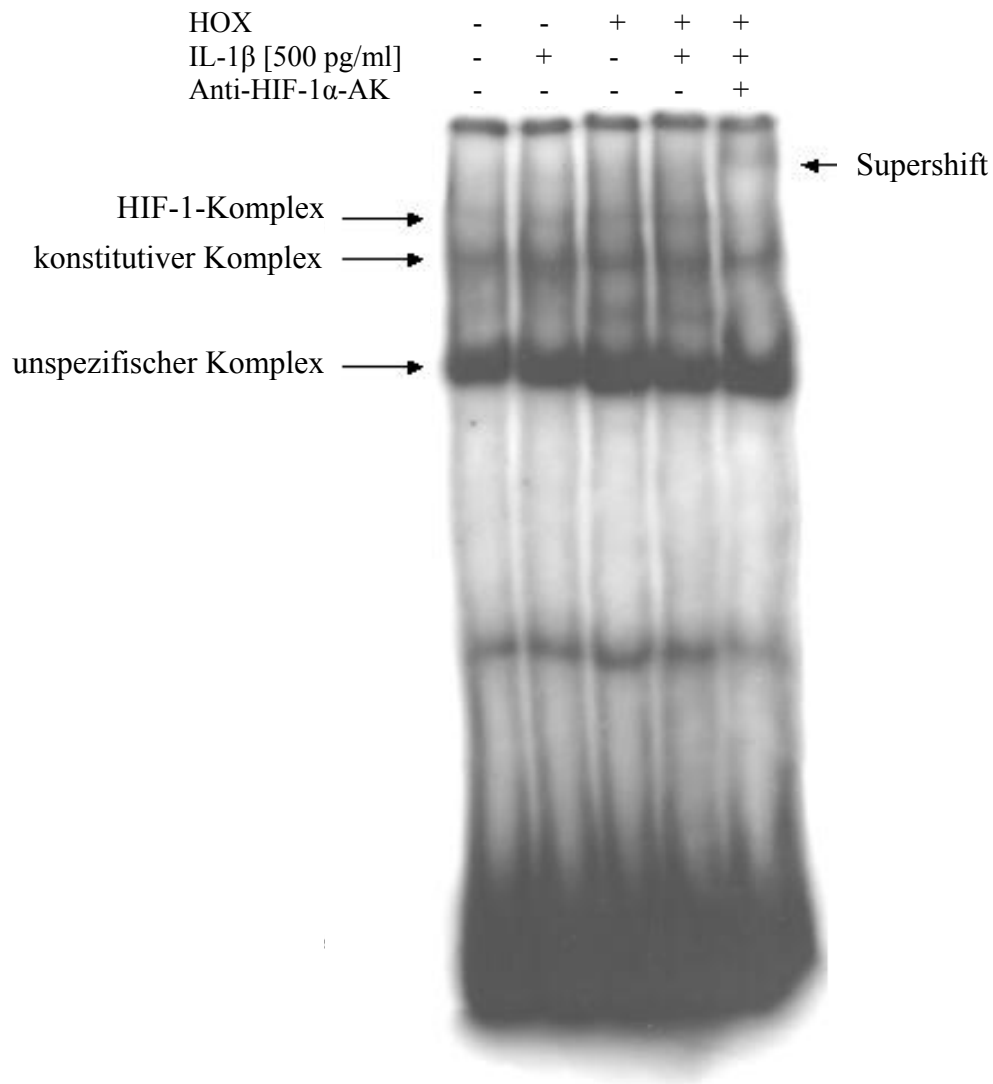
### **3.1.7 Untersuchung der Bindungsaktivität des HIF-1-Komplexes mithilfe des Electrophoretic-mobility-shift-assays (EMSA)**

Um herauszufinden, ob das unter Zytokinen vermehrt vorhandene HIF-1 $\alpha$  in den Kern transloziert wird und dort als Bestandteil des HIF-1-Komplexes an die DNA bindet, wurde mithilfe des EMSA die Bindung von HIF-1 an die DNA untersucht.

Die radioaktiv-markierten Ansätze wurden auf ein 5 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. In den ersten beiden Spuren wurden die normoxischen Proben geladen: in Spur 1 wurde ein Extrakt unbehandelter Zellen, in Spur 2 ein Extrakt mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  behandelter Proben geladen. Analog wurde bei den hypoxischen Proben vorgegangen, die sich in Spur 3 und 4 befanden: in Spur 3 wurden die unbehandelten Zellen und in Spur 4 die mit IL-1 $\beta$  behandelten Zellen pipettiert. In der fünften Spur wurde eine Probe aufgetragen, die zusätzlich noch einen Antikörper gegen das HIF-1 $\alpha$ -Protein enthielt.

**OVCAR-3**

**Abb. 3.9 Darstellung des HIF-1 $\alpha$ -EMSA mit Extrakten aus OVCAR-3-Zellen:** Mithilfe eines EMSAs wurde untersucht, ob das unter Zytokin-Einfluss vermehrt vorhandene HIF-1-Protein im Kern an die DNA bindet. Es zeigte sich sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine Reduktion der Laufgeschwindigkeit bei den mit IL-1 $\beta$ -versetzten Proben. Das verlangsamte Laufverhalten ist auf die Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes zurückzuführen.

**HTB-77**

**Abb. 3.10 Darstellung des HIF-1 $\alpha$ -EMSAs in HTB-77-Zellen:** Um zu erfahren, ob das unter Zytokineinfluss vermehrt vorhandene HIF-1 $\alpha$ -Protein im Kern an die DNA bindet, wurde ein EMSA durchgeführt. Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zeigte sich eine Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit bei den mit IL-1 $\beta$ -versetzten Proben. Dieses reduzierte Laufverhalten ist auf die Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes zurückzuführen, das heißt, das HIF-1 $\alpha$ -Protein hat an die DNA gebunden. Durch die Zugabe eines spezifischen Antikörpers in Spur 5 konnte das HIF-1 $\alpha$  als Bestandteil des DNA-Proteinkomplexes identifiziert werden.

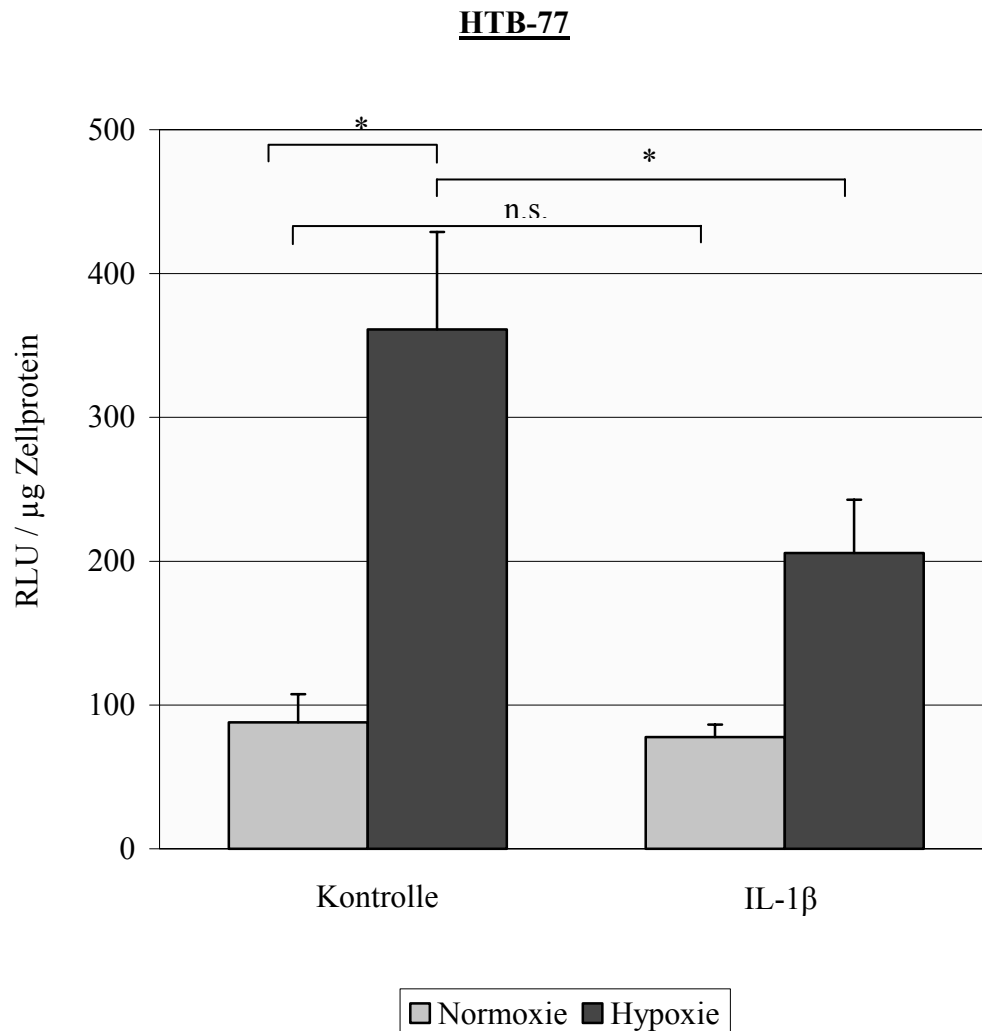
Es zeigte sich eine Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit in den mit IL-1 $\beta$  behandelten Proben (Spur 2 und 4). Diese Reduktion der Laufgeschwindigkeit beweist, dass es zu Protein-DNA-Wechselwirkungen kommt und HIF-1 mit der DNA einen Komplex ausbildet. In Spur 5, die zusätzlich noch mit einem HIF-1 $\alpha$ -spezifischen Antikörper versetzt wurde, konnte eine weitere Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit des Komplexes festgestellt werden. Dieses veränderte Laufverhalten ist darauf zurückzuführen, dass der Antikörper an den Protein-DNA-Komplex gebunden hat und es zur Ausbildung eines Supershifts gekommen ist. Der Supershift beweist, dass HIF-1 $\alpha$  Bestandteil des Komplexes ist.

### **3.1.8 Überprüfung der Transkription-steigernden Aktivität von HIF-1 $\alpha$ mithilfe des Reportergenassays mit dem Vektor pH3SVL**

Die zuvor durchgeführten Versuche ergaben, dass es unter dem Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$  zu einer gesteigerten Expression des HIF-1 $\alpha$ -Gens kommt und die HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge zunimmt. Nachdem anhand des EMSAs nachgewiesen werden konnte, dass das vermehrt vorhandene Protein im Kern an die DNA bindet, sollte nun die Transkription-steigernde Aktivität des gebundenen Transkriptionsfaktors untersucht werden.

Der pH3SVL-Vektor wurde mittels des Tfx-20-Reagenz in die Zellen eingeschleust. Anschließend wurden die Zellen mit 500 pg/ml des Zytokins IL-1 $\beta$  behandelt und für 3 Stunden unter 3 % und 21 % Sauerstoff kultiviert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt.

Die Einheit der erfassten Lichtemission wird als relative Lichteinheit (RLU) pro  $\mu$ g Zellprotein angegeben (RLU/ $\mu$ g Zellprotein).



**Abb. 3.11 Aktivität von HIF-1 in HTB-77-Zellen:** Um die Transkriptionsaktivität des unter Zytokineinfluss gebildeten HIF-1 $\alpha$ -Proteins zu untersuchen, wurden die HTB-77-Zellen mit dem Vektor pH3SVL transfiziert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit IL-1 $\beta$  [500 pg/ml] versetzt und ein Teil nicht. Sodann wurden beide Ansätze jeweils für 3 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Zellen lysiert. Danach wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Es konnte eine verminderte Luciferaseaktivität bei den mit IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Proben festgestellt werden.

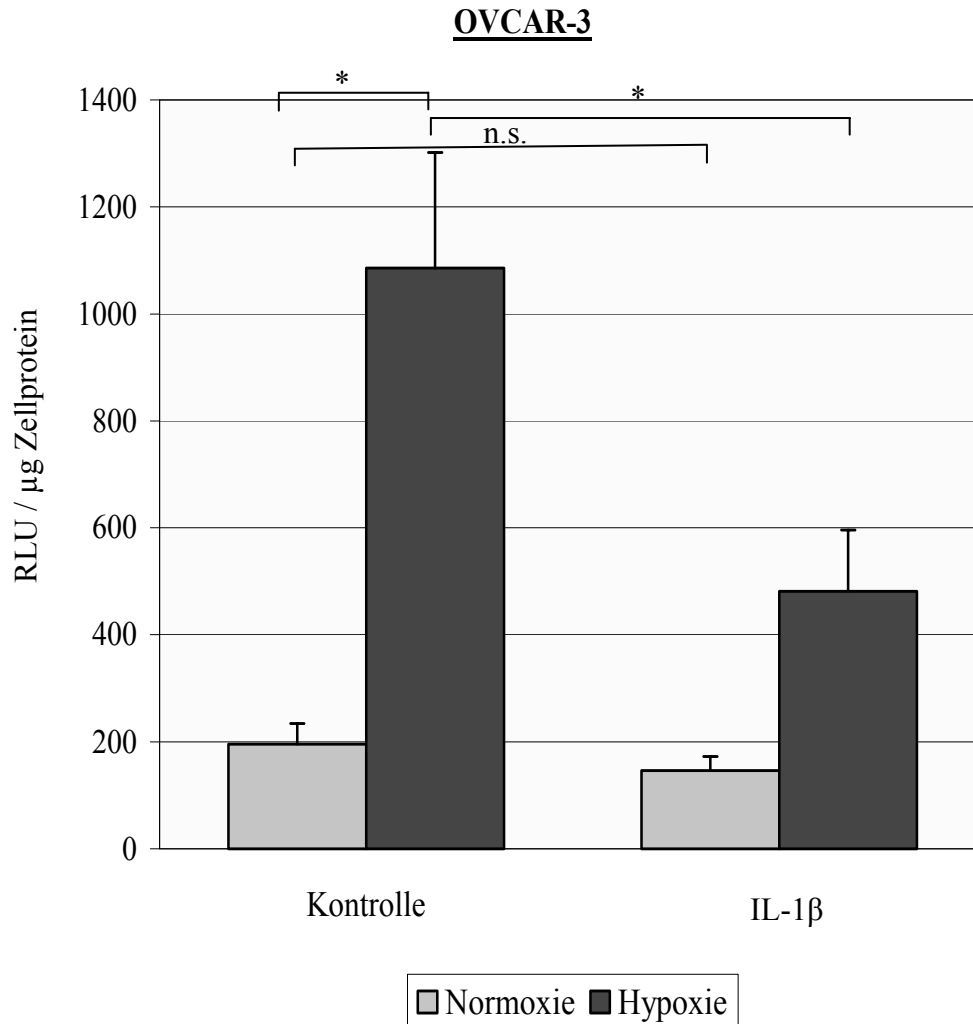
RLU = relative Lichteinheiten

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von  $n = 3$  Kulturschalen;

\* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

\* =  $p < 0,05$





**Abb. 3.12 Aktivität von HIF-1 in OVCAR-3-Zellen:** Analog zu dem in Abbildung 3.11 beschriebenen Versuch mit den HTB-77-Zellen wurden die OVCAR-3-Zellen behandelt. Auch bei dieser Zelllinie zeigte sich eine reduzierte Luciferaseaktivität bei den Zytokin-versetzten Zellen verglichen mit den unbehandelten Proben.

RLU = relative Lichteinheiten

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von  $n = 3$  Kulturschalen;

\* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

\* =  $p < 0,05$

Im Reportergenassay zeigte sich eine verminderte Aktivität bei den Zellen, die mit IL-1 $\beta$  inkubiert worden waren. Diese Beobachtung konnte bei beiden Zelllinien sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie gemacht werden.

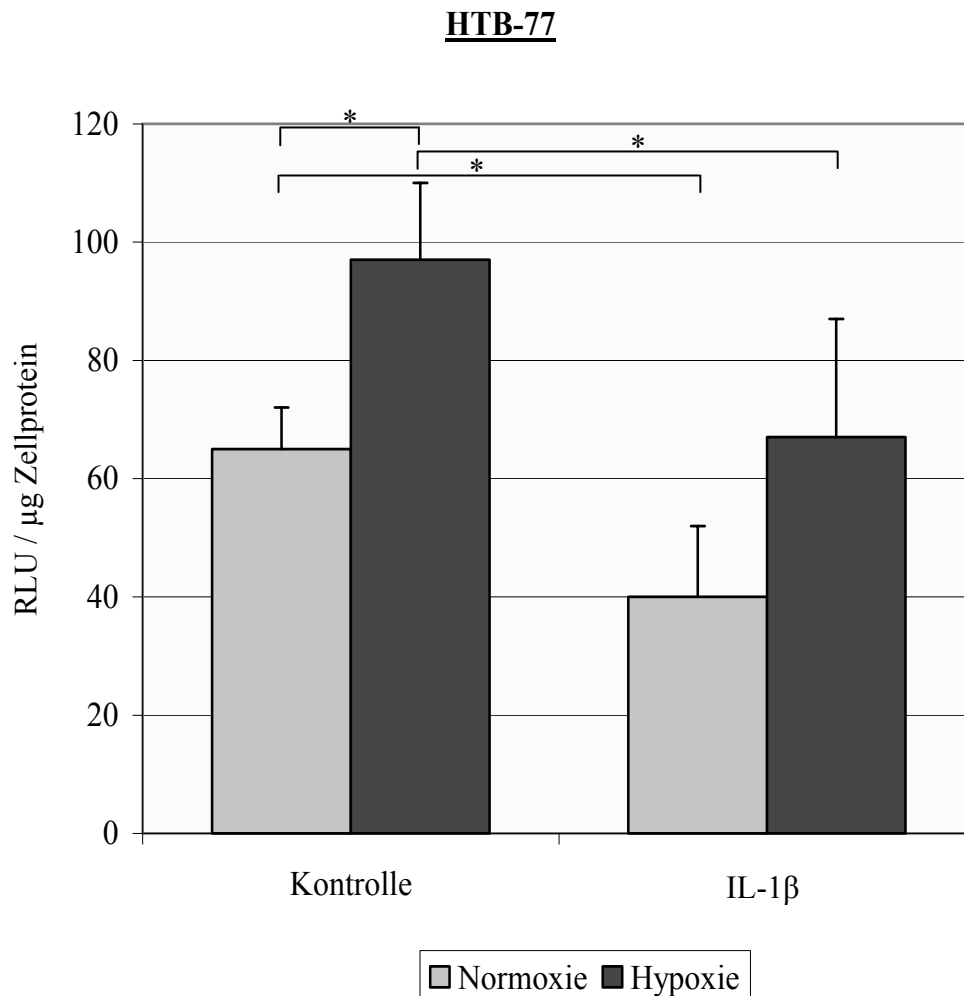
Anhand dieser Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass das unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$  vermehrt vorhandene HIF-1 $\alpha$ -Protein zwar in den Kern gelangt und mit der DNA einen Komplex ausbildet, es aber keine Transkription-steigernde Aktivität besitzt.

### **3.1.9 Untersuchungen zur Transkription-steigernden Aktivität des C-Terminus von HIF-1 $\alpha$ mithilfe des Reportergenassays mit dem Vektor Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TAD-C**

Nachdem in den zuvor durchgeführten Reportergenassays in beiden Zelllinien beobachtet werden konnte, dass IL-1 $\beta$  sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer Reduktion der Reportergenaktivität führt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-1 $\beta$  das HIF-1 $\alpha$ -Protein posttranslational modifiziert. Diese Veränderungen erlauben zwar die Bindung des Proteins an die DNA, hemmen aber die Transaktivierungsaktivität des HIF-1 $\alpha$ .

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein chimeres Aktivator/Reporter-System genutzt. In diesem wurde die C-terminale Transaktivierungsdomäne von HIF-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ -TAD-C) mit dem verkürzten Transkriptionsfaktor Gal4 aus der Hefe vereinigt. Dieses fusionierte Protein fungierte als Aktivator für das Gal4-Luciferase-Reporter-Plasmid. Die HIF-1 $\alpha$ -TAD-C wurde verwendet, weil von ihr bekannt ist, dass sie die Transkriptionsaktivität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins vermittelt.

Sobald die Zellen mit den beiden Plasmiden transfiziert waren, wurden sie mit IL-1 $\beta$  versetzt und für 3 Stunden unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen inkubiert.



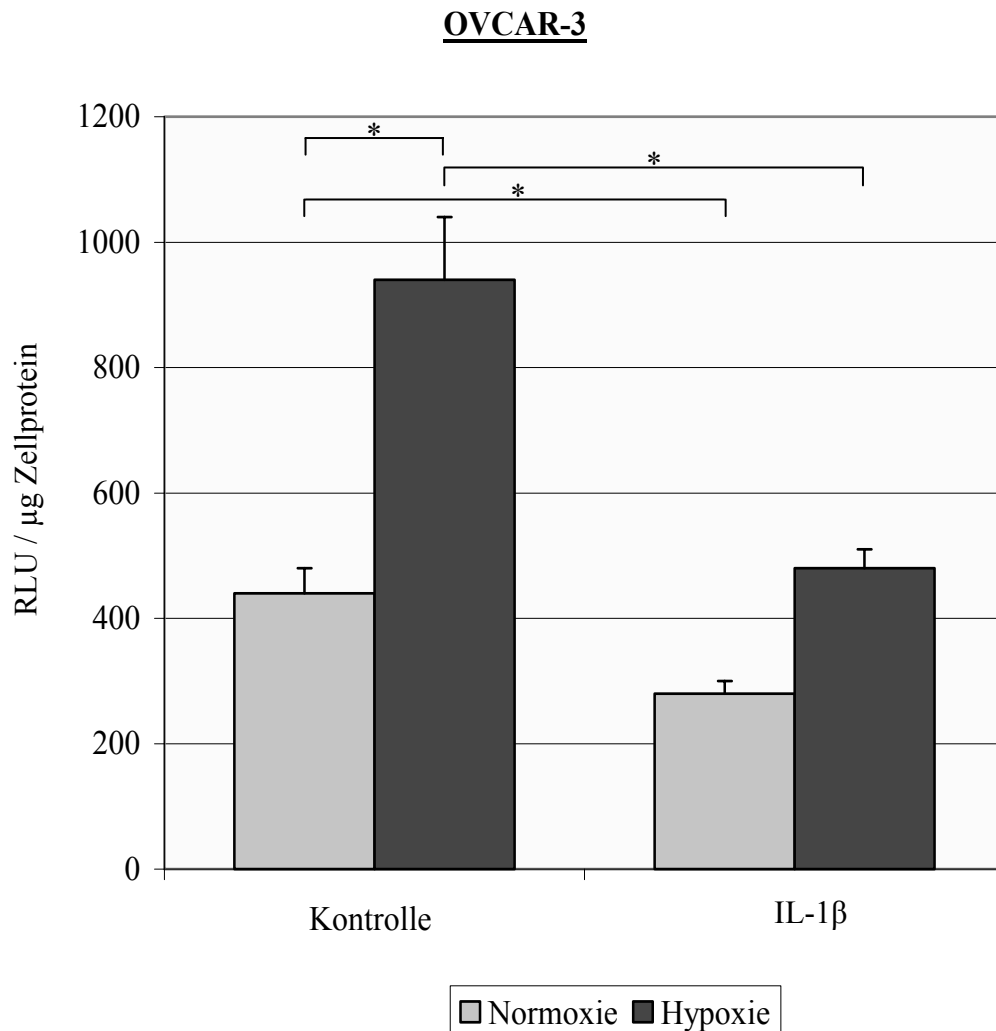
**Abb. 3.13 Aktivität der TAD-C von HIF-1 $\alpha$  in HTB-77-Zellen:** Als Aktivator wurde der Vektor Gal4-HIF-1 $\alpha$ -TAD-C eingesetzt, der ein Fusionsprotein aus der C-terminalen Transaktivierungsdomäne des HIF-1 $\alpha$  mit dem Transkriptionsfaktor Gal4 aus der Hefe darstellt. Nachdem sowohl der Aktivator als auch das Reporterplasmid Gal4-Luciferase in die Zellen eingebracht waren, wurden die Proben mit IL-1 $\beta$  [500 pg/ml] versetzt und für 3 Stunden unter Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. Sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie konnte eine geringere Luciferasemenge bei den mit IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen festgestellt werden.

RLU = relative Lichteinheiten

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von  $n = 3$  Kulturschalen;

\* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

\* =  $p < 0,05$



**Abb. 3.14 Aktivität der TAD-C vom HIF-1 $\alpha$  in OVCAR-3-Zellen:** Analog zu dem in Abbildung 3.13 dargestellten Versuch mit den HTB-77-Zellen wurde bei den OVCAR-3-Zellen vorgegangen. Die Auswertung des Luciferaseassays ergab eine Reduktion der Reporterogenaktivität in Normoxie und Hypoxie bei den mit IL-1 $\beta$ -inkubierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Proben.

RLU = relative Lichteinheiten

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von  $n = 3$  Kulturschalen;

\* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

\* =  $p < 0,05$

In dem anschließend durchgeführten Reporterassay zeigte sich bei beiden Zelllinien eine deutliche Induktion der Luciferase-Aktivität unter hypoxischen Bedingungen bei den Kontrollproben. Somit scheint die C-terminale Transaktivierungsdomäne des HIF-1 $\alpha$  auszureichen, um die Transkription-steigernde Aktivität von HIF-1 $\alpha$  zu vermitteln. Verglichen mit den unbehandelten Proben konnte eine deutliche Reduktion der Reporteraktivität bei den mit dem Zytokin versetzten Zellen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie festgestellt werden. Diese verminderte Luciferase-Aktivität deutet darauf hin, dass IL-1 $\beta$  im Bereich der Aminosäuren 725-826 der C-terminalen Transaktivierungsdomäne das HIF-1 $\alpha$ -Protein modifiziert. Durch diese Veränderungen kann das HIF-1 $\alpha$ -Protein zwar noch im Kern an die DNA binden, seine Transkription-steigernde Aktivität wird jedoch gehemmt.

### **3.2 Untersuchungen zur Bildung von VEGF**

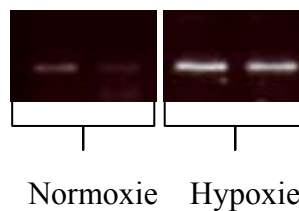
#### **3.2.1 Hypoxie als Stimulus für die Expression des Gens für VEGF**

VEGF ist ein wichtiges Zielgen von HIF-1 (Forsythe et al., 1996). Bei mangelhafter Sauerstoffversorgung, wie sie zum Beispiel im Tumorgewebe zu finden ist, entstehen hypoxische Bedingungen, bei denen es zu einer Zunahme von HIF-1 $\alpha$  und nachfolgend von VEGF kommt (Ferrara et al., 1997). Da dem VEGF eine entscheidende Rolle bei der Gefäßneubildung zugesprochen wird (El Awad et al., 2000), die eine wichtige Voraussetzung für weiteres Tumorstadium ist, wurde die Expression des HIF-1-Zielgens VEGF untersucht.

Anhand der zunächst durchgeführten RT-PCR sollte überprüft werden, ob die Zelllinien HTB-77 und OVCAR-3 unter Hypoxie ebenfalls vermehrt das VEGF-Gen exprimieren.

Die Zellen wurden für 6 Stunden normoxischen oder hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Nach erfolgter RNA-Präparation sowie Reverser Transkription wurde die PCR für die cDNA der dominierenden Isoform VEGF<sub>165</sub> ausgeführt.

### **HTB-77**



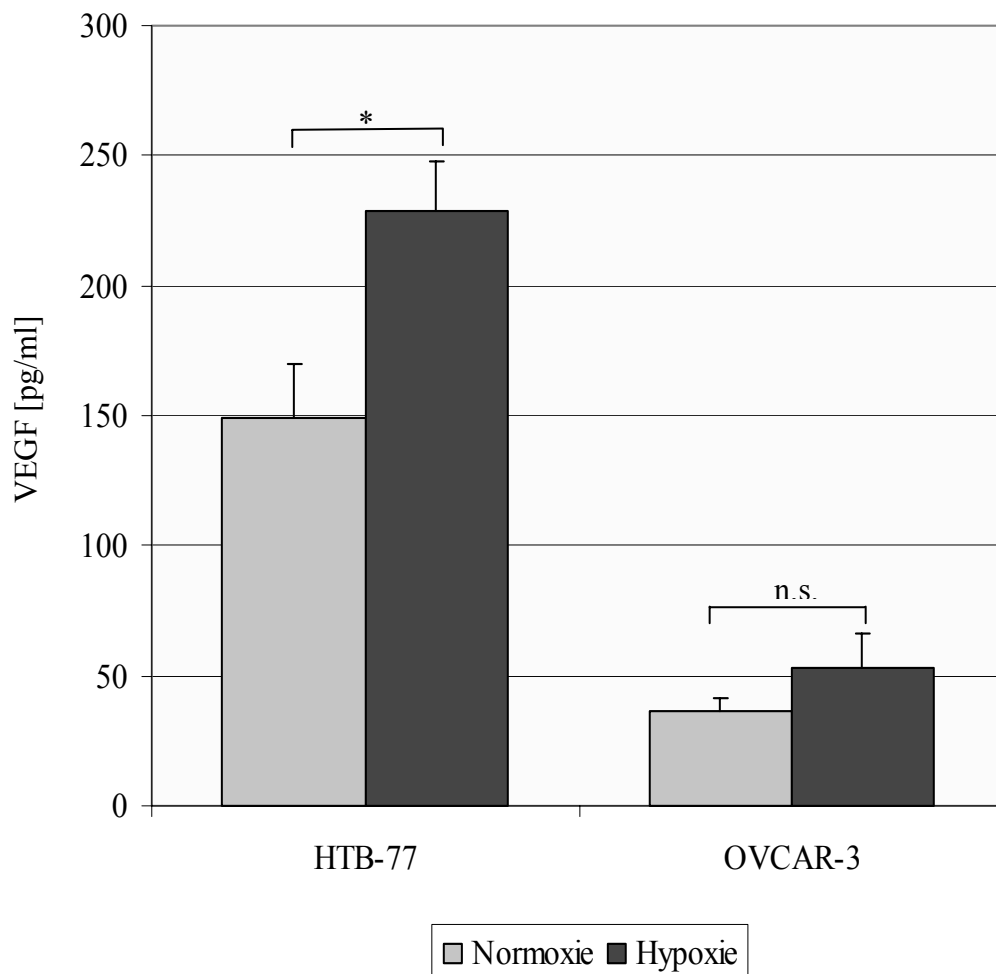
**Abb. 3.15 PCR für die VEGF-cDNA aus der RNA von HTB-77-Zellen:** Die Zellen wurden vor der RT für 6 Stunden in 3 % oder 21 % Sauerstoff inkubiert. In der darauf folgend durchgeführten PCR zeigte sich eine gesteigerte Induktion der VEGF-Genexpression unter Hypoxie.  
n = 5

Die Analyse mithilfe der RT-PCR ergab eine Zunahme der VEGF-Genexpression unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu den normoxischen Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Zellen auf den Stimulus Hypoxie mit einer Vermehrung der VEGF-Expression reagieren.

### **3.2.2 Bestimmung der VEGF-Proteinbildung unter Hypoxie**

Darauf folgend wurde überprüft, ob die vermehrte Expression des VEGF-Gens auch von einer Erhöhung der VEGF-Proteinbildung begleitet wird. Mithilfe des ELISAs kann die Menge des Proteins bestimmt werden, die in den Zellüberstand sezerniert wurde.

Nachdem die Zellen für einen Zeitraum von 3 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 3 % oder 21 % ausgesetzt worden waren, wurde sofort der Überstand abgenommen und mithilfe des ELISAs die VEGF-Konzentration gemessen.



**Abb. 3.16 VEGF-Konzentration im Überstand von HTB-77- und OVCAR-3-Zellen nach normoxischer und hypoxischer Inkubation:** Mithilfe des ELISAs wurde die VEGF-Proteinmenge aus dem Zellüberstand bestimmt. Die Zellen wurden für 6 Stunden unter 3 % oder 21 % Sauerstoff inkubiert, bevor der Überstand abgenommen wurde. Im ELISA war eine Zunahme der Proteinmenge unter Hypoxie zu beobachten. Diese Steigerung der Proteinmenge ließ sich für beide untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinien bestätigen.

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von  $n = 3$  Kulturschalen;

\* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

\* =  $p < 0,05$

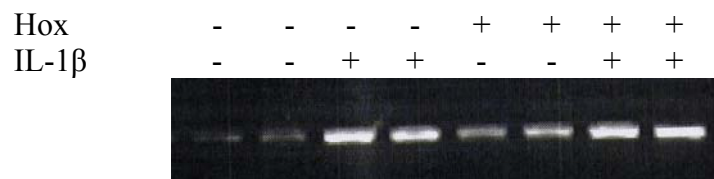
Im ELISA zeigte sich eine Zunahme der VEGF-Proteinmenge unter Hypoxie. Diese hypoxische Stimulation der VEGF-Bildung konnte sowohl für die HTB-77- als auch für die OVCAR-3-Zellen nachgewiesen werden.

Unter Hypoxie kommt es somit neben einer vermehrten VEGF-Genexpression auch zu einer Steigerung der Proteinbildung und -sekretion.

### 3.2.3 Untersuchungen über den Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ auf die VEGF-Genexpression

Der Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$  auf die VEGF-Genexpression wurde unter Normoxie und Hypoxie untersucht. Die Zellen wurden mit und ohne 500 pg/ml IL-1 $\beta$  für 3 Stunden in einer normoxischen oder hypoxischen Umgebung exponiert. Mithilfe der RT-PCR wurde das Ausmaß der VEGF-Genexpression qualitativ bestimmt.

#### OVCAR-3



**Abb. 3.17 VEGF-PCR von mit IL-1 $\beta$  inkubierten OVCAR-3-Zellen:** Die Zellen wurden mit oder ohne 500 pg/ml IL-1 $\beta$  für 3 Stunden unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Es zeigte sich eine Zunahme der Genexpression durch IL-1 $\beta$  im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Diese Zunahme der VEGF-Expression ist sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie nachweisbar.

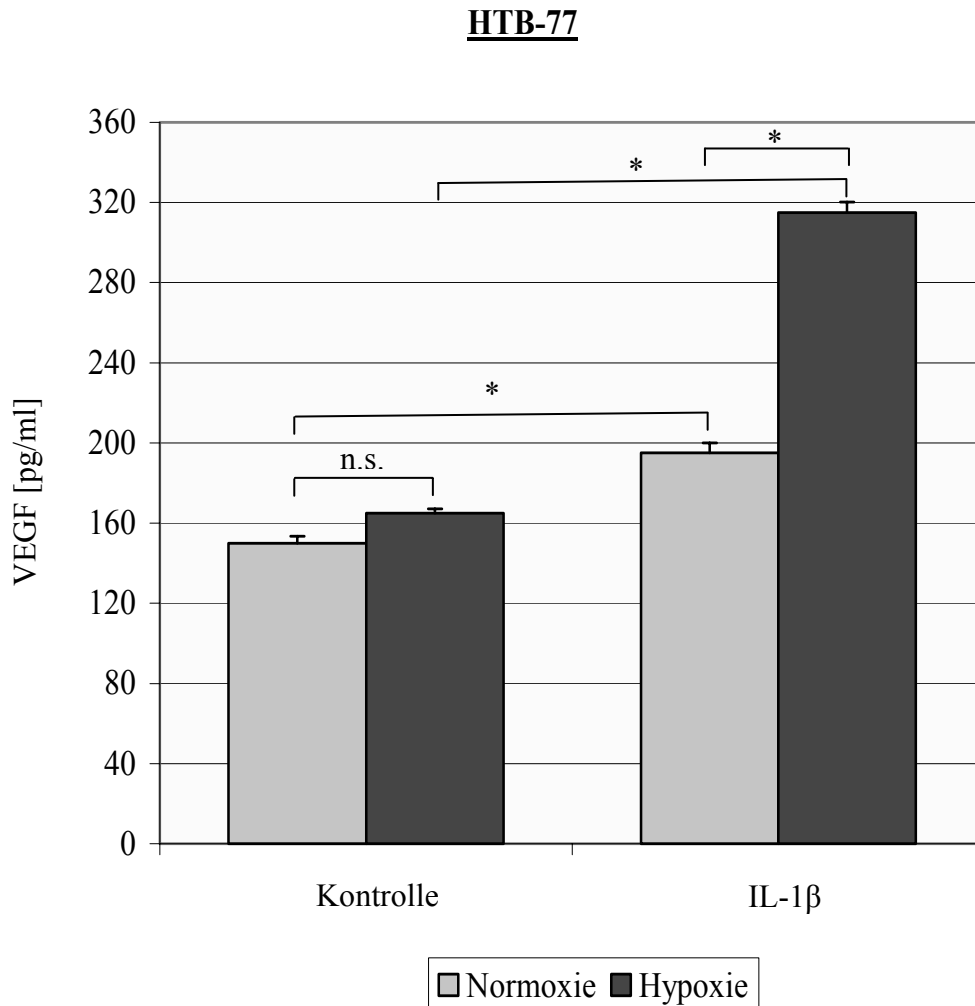
n = 5



Das Ergebnis der PCR zeigte eine Erhöhung der VEGF-Genexpression unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$ . Dieser stimulierende Einfluss des Zytokins konnte sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie beobachtet werden.

#### **3.2.4 Bestimmung der VEGF-Proteinsekretion unter dem Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ mithilfe des ELISAs**

Um herauszufinden, ob sich die gesteigerte VEGF-Expression durch den Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$  auch in einer quantitativen Steigerung des Proteins widerspiegelt, wurde die Proteinmenge in den Zellüberständen gemessen. Die Zellen wurden mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  versetzt und dann für 3 Stunden in normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde direkt der Überstand abgenommen und die VEGF-Proteinmenge anhand des ELISAs bestimmt.

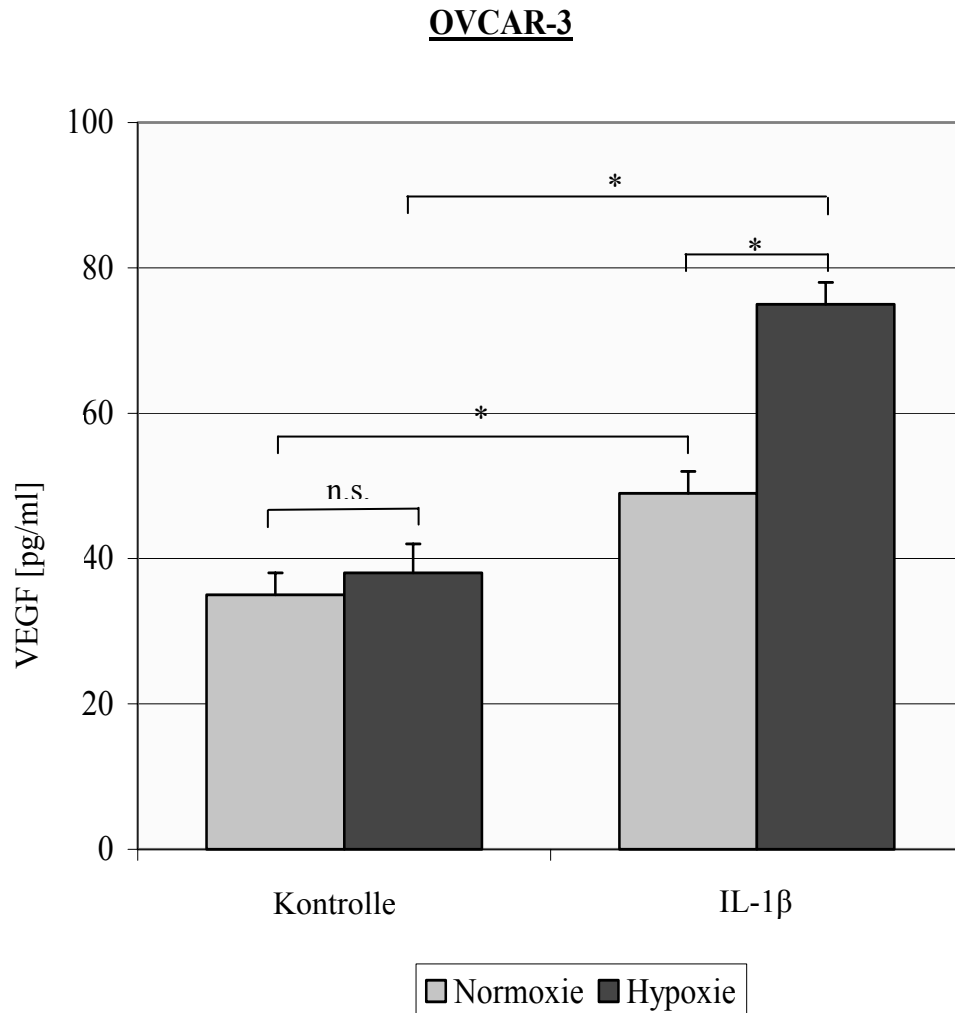


**Abb. 3.18 Ergebnisse des VEGF-ELISA für die HTB-77-Zellen:** Nachdem die Zellen mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  versetzt worden waren, wurden sie für 3 Stunden in normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Es zeigte sich bei den mit IL-1 $\beta$  inkubierten HTB-77-Zellen eine verstärkte VEGF-Sekretion in Normoxie und Hypoxie. Verglichen damit war die Proteinmenge bei den unbehandelten Zellen unter Normoxie und Hypoxie geringer. Dennoch konnte auch bei diesen Proben eine Zunahme des VEGF-Gehaltes unter Hypoxie gefunden werden.

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von  $n = 3$  Kulturschalen;

\* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

\* =  $p < 0,05$



**Abb. 3.19 Ergebnisse des VEGF-ELISAs von OVCAR-3-Zellen:** Die mit dem Zytokin IL-1 $\beta$  versetzten Zellen wurden für 3 Stunden in einer Sauerstoffkonzentration von 3 % oder 21 % inkubiert. Im anschließend durchgeführten ELISA wurde die Proteinmenge aus dem Überstand bestimmt. Hierbei zeigte sich sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine Zunahme der VEGF-Menge unter dem Einfluss des Zytokins verglichen mit den Kontrollproben.

Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung von  $n = 3$  Kulturschalen;

\* zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

\* =  $p < 0,05$

Bei der Auswertung der ELISAs zeigte sich bei beiden Zelllinien eine erhöhte VEGF-Menge unter Zytokineinfluss. Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie befand sich im Überstand der mit IL-1 $\beta$  inkubierten Zellen mehr Protein als in den unbehandelten Proben. In beiden Zellen konnte eine Steigerung des VEGF-Gehaltes unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass es unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$  zu einer Zunahme der VEGF-mRNA-Expression und der VEGF-Proteinsynthese sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen kommt.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Regulation von HIF-1 $\alpha$

Auf der Suche nach Proteinen, die Hypoxie induziert an das Hypoxia response element des Erythropoietin-Gens binden (Semenza et al., 1992), wurde der Transkriptionsfaktorkomplex HIF-1 isoliert. Im Laufe weiterer Untersuchungen zeigte sich, dass HIF-1 darüber hinaus die Transkription einer Reihe weiterer O<sub>2</sub>-sensitiver Gene induzieren kann und demnach ein bedeutender Teil eines umfangreichen Sauerstoff-regulierten Systems ist (Wang et al., 1996; Gassmann et al., 1997; Gleadle et al., 1998). Die Gruppe dieser unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck vermehrt exprimierten Gene wird laufend ergänzt. Wichtige Mitglieder sind besonders VEGF (Forsythe et al., 1996) sowie das für die Bildung der roten Blutkörperchen benötigte EPO (Wang et al., 1993).

Das HIF-1-Protein setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen (Wang et al., 1995), wobei die  $\beta$ -Untereinheit des Proteins (HIF-1 $\beta$ ) ständig gebildet wird und identisch ist mit dem AhR Nuclear Translocator (ARNT; Hoffman et al., 1991). Die  $\alpha$ -Untereinheit des Proteins (HIF-1 $\alpha$ ) gehört derselben Proteinfamilie wie ARNT an, ist aber im Unterschied zu HIF-1 $\beta$  Sauerstoff-sensitiv. Bei hohem PO<sub>2</sub> wird die  $\alpha$ -Untereinheit zwar ständig gebildet, aber sofort wieder über Proteasomen abgebaut. Nur unter Hypoxie kann die  $\alpha$ -Untereinheit akkumulieren und die Expression von HIF-1-abhängigen Genen stimulieren. Dem liegt folgender Sensormechanismus zugrunde:

In Anwesenheit von Sauerstoff kommt es durch Enzyme zu Veränderungen in der Oxygen-dependent degradation domain (ODDD) des HIF-1 $\alpha$ -Proteins (Huang et al., 1998). Anhand von Experimenten wurde nachgewiesen, dass bei diesen Modifikationen zwei Prolin-Reste (Pro402 und Pro564) dieser Domäne hydroxyliert werden (Jaakola et al., 2001). Die hierbei entscheidenden Enzyme werden als Prolyl-4-Hydroxylasen (PHD) bezeichnet, von denen bis jetzt drei Isoformen gefunden

werden konnten (PHD1, PHD2, PHD3; Epstein et al., 2001) und deren Aktivität auf O<sub>2</sub> angewiesen ist.

Die Hydroxylierung der Prolinreste ist Voraussetzung für die Bindung des Von-Hippel-Lindau-Proteins (pVHL) an die ODDD (Maxwell et al., 1999). Das pVHL wird zu den Tumor-Suppressor-Proteinen gezählt. Das an den Prolin-Resten hydroxylierte HIF-1 $\alpha$  kann pVHL binden, das dann eine E3-Ubiquitinligase rekrutiert. Ubiquitiniertes HIF-1 $\alpha$  wird sehr schnell im Proteasomensystem abgebaut. Die Bedeutung von pVHL für den Abbau von HIF-1 $\alpha$  zeigte sich in Versuchen an Nierenkarzinomzellen, bei denen das pVHL durch eine Mutation nicht mehr aktiv war. Selbst unter Normoxie konnte bei diesen Zellen eine erhebliche Menge von HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen werden (Krieg et al., 2000). Die Hydroxylierung in der ODDD scheint somit eine entscheidende Rolle in der Regulation der Stabilität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins zu spielen.

Weitere Experimente ergaben, dass es auch in anderen Bereichen des HIF-1 $\alpha$ -Proteins zu einer Sauerstoff-abhängigen Hydroxylierung kommt. Als eine solche Stelle konnte die C-terminale Transaktivierungsregion (TAD-C) der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit identifiziert werden (Lando et al., 2002). Im Gegensatz zu der Hydroxylierung der Prolinreste in der ODDD, die sich auf die Stabilität des Proteins auswirkt, trägt der in der TAD-C hydroxylierte Asparaginrest (Asn803) entscheidend zur Regulation der Transkriptionsaktivität des HIF-1 $\alpha$  bei. Unter Hypoxie liegt die Aminosäure Asn803 im nicht-hydroxylierten Zustand vor und es kommt zu Interaktionen mit den Koaktivatoren CBP/p300 (Lando et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist die TAD-C unter Normoxie völlig „stumm“ (O'Rourke et al., 1999). Neuere Daten führten zu der Vermutung, dass die Hydroxylierung von Asn803 der Grund für die komplette „Stille“ der TAD-C unter Normoxie ist (Lando et al., 2002) und demnach die hydroxylierte Aminosäure nicht nur die Interaktionen mit CBP/p300 hemmt, sondern auch die Wechselwirkungen mit weiteren Transkriptionsfaktoren verhindert. Da das für die Hydroxylierung der Asparaginreste verantwortliche Enzym die Aktivität von

HIF-1 $\alpha$  hemmt, wird es auch als Factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) bezeichnet. Es benötigt für seine Aktivität ebenso wie die PHDs Sauerstoff (Lando et al., 2002).

Obwohl die Bedeutung der TAD-C bereits seit einiger Zeit bekannt ist, konnte noch nicht bis ins letzte Detail geklärt werden, wie genau die Wechselwirkungen zwischen dem HIF-1 $\alpha$ -Protein und den verschiedenen Koaktivatoren aussehen. Durch Studien aus neuester Zeit konnte nachgewiesen werden, dass die TAD-C des HIF-1 $\alpha$ -Gens in freier Lösung unstrukturiert vorliegt (McNeill et al., 2002). Sobald es zu Interaktionen mit dem Zink-Motiv der Cystein/Histidin-reichen Domäne des Transkriptionsfaktors p300 kommt, wird Asn803 in einer hydrophoben Tasche begraben und die Seitenketten des Amids unterstützen die Aufrechterhaltung einer kurzen  $\alpha$ -helikalen Region (McNeill et al., 2002). Welche Rolle dabei den Veränderungen von Asn803 zukommt und an welcher Stelle der Aminosäure sie genau stattfinden, ist bisher unklar. Es wird allerdings vermutet, dass die Hydroxylierung entweder an einer Stelle der Seitenkette oder an einem  $\beta$ -Carbon des Amids abläuft. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass Modifikationen in den genannten Bereichen zur Destabilisierung des HIF-1 $\alpha$ /p300-Komplexes führen (McNeill et al., 2002).

Somit scheinen mindestens zwei große Systeme an der hypoxischen Induktion des HIF-1 $\alpha$ -Proteins beteiligt zu sein. Zum einen muss die Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung der Prolinreste in der ODDD gehemmt werden, um die Interaktionen des HIF-1 $\alpha$  mit dem pVHL zu verhindern und hierdurch der proteosomalen Degradation zu entgehen. Zum anderen muss die Hydroxylierung des Asparaginrestes in der TAD-C unterbunden werden, damit Interaktionen mit den Faktoren p300/CBP zustande kommen und die Transkription der Zielgene durch HIF-1 $\alpha$  induziert werden kann.

Solide Tumoren enthalten stets hypoxische Regionen, und da mehrere wichtige Gene durch eine verminderte Sauerstoffkonzentration aktiviert werden, spielt die Tumorphoxie eine entscheidende Rolle in der klinischen Prognose von Karzinomerkrankungen (Nordsmark et al., 1996).

Um zu überprüfen, ob die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  in den Ovarialkarzinom-Zelllinien HTB-77 und OVCAR-3 induziert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen für 3 Stunden einer Sauerstoffkonzentration von 3 % ausgesetzt. In der anschließend durchgeführten PCR zeigte sich eine Steigerung der HIF-1 $\alpha$ -Expression unter Hypoxie. Demnach führt ein reduziertes Sauerstoffangebot auch bei den Ovarialkarzinomen zu einer Vermehrung von HIF-1 $\alpha$ . Ähnliche Ergebnisse sind in der Literatur unter anderem von Pankreaskarzinomen (Buchler et al., 2003) sowie von anderen Ovarialkarzinom-Zelllinien (Nakayama et al., 2001) zu finden.

Auch auf der Proteinebene wurde in der vorliegenden Arbeit bei den untersuchten Tumorzellen im Western Blot eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Menge unter Hypoxie festgestellt. Worauf die gesteigerte Proteinmenge zurückzuführen ist, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Grundsätzlich sind drei Varianten möglich: entweder liegt eine verminderte Degradation des Proteins vor oder HIF-1 $\alpha$  wird vermehrt gebildet; aber auch eine Kombination von beiden Möglichkeiten wäre denkbar.

Der Grund für die erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge unter Hypoxie könnte eine vermehrte HIF-1 $\alpha$ -Genexpression unter Hypoxie sein, der sich dann direkt eine gesteigerte Proteinsynthese anschließt.

Eine weitere Ursache für die gesteigerte Proteinmenge unter Hypoxie könnten Modifikationen sein, die die Stabilität von HIF-1 $\alpha$  erhöhen. Die Degradation des Proteins wird sowohl durch die Aktivität der PHDs beeinflusst, als auch durch die Funktion des pVHL vermittelt, das Teil des abbauenden Ubiquitin-Systems ist. Für Regulationsvorgänge in diesen Bereichen spricht, dass unter IL-1 $\beta$ -Einfluss das HIF-1 $\alpha$ -Protein deutlich länger nachzuweisen ist.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben ferner Unterschiede in der Stabilität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins bei den beiden Zellarten. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf Unterschiede in der Zelldichte zurückzuführen, da die OVCAR-3-Zellen zumeist dichter als die HTB-77-Zellen gewachsen sind und dadurch einem verminderten Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt waren.



## **4.2 Die Regulation von VEGF**

Ein wichtiges Zielgen des HIF-1-Komplexes ist das VEGF, das HIF-vermittelt unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird (Forsythe et al., 1996). Dem VEGF wird eine entscheidende Rolle in der Angiogenese zugesprochen (Ferrara et al., 1997), die einen wichtigen prognostischen Faktor im Rahmen einer Tumorerkrankung darstellt (Folkman, 2002). Neue Gefäße werden vom Tumor nicht nur als Versorgungswege benötigt, sondern sind auch die Voraussetzung für seine Metastasierung (Folkman, 2002). Neben der Bildung größerer versorgender Blutbahnen fördert das VEGF in Ovarialkarzinomen auch die Entstehung von Mikrogefäßen. Diese kleinen Gefäße werden für die Bildung von Aszites verantwortlich gemacht, der sehr häufig bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom gefunden wird. Aufgrund der vielfältigen Auswirkungen des VEGF wurde in der vorliegenden Arbeit dessen Expression in den Ovarialkarzinom-Zelllinien bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Die HTB-77- und OVCAR-3-Zellen wurden für 3 Stunden bei 3 % oder 21 % Sauerstoff kultiviert. Mithilfe der PCR konnte gezeigt werden, dass es unter einem verminderten Sauerstoffpartialdruck bei den Ovarialkarzinomen zu einer Induktion des VEGF-Gens kommt. Entsprechende Beobachtungen sind in der Literatur für proximale Tubuluszellen (El Awad et al., 2000), synoviale Fibroblasten (Jackson et al., 1997) sowie eine Reihe weiterer Zellen beschrieben worden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass VEGF ein wichtiges Zielgen des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  ist und unter Hypoxie vermehrt ausgeschüttet wird.

## **4.3 Der Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$ auf HIF-1 $\alpha$**

Aufgrund der Beobachtung, dass es bei einer Vielzahl von Karzinomen neben der Entstehung von Hypoxie auch zu einer Zunahme der Zytokinausschüttung kommt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Zytokins IL-1 $\beta$  auf die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  sowie des Gens VEGF untersucht.

Die Zytokinausschüttung im Tumorgewebe erfolgt wahrscheinlich hauptsächlich durch Makrophagen, die durch den Entzündungsreiz angelockt werden, der von den Karzinomen ausgeht (Saijo et al., 2002). Die Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie durch die Inkubation mit Zytokinen konnte bereits an HepG2-Zellen (Hellwig-Bürgel et al., 1999) und synovialen Fibroblasten (Thornton et al., 2000) nachgewiesen werden. Der Grund für die durch IL-1 $\beta$ -geförderte HIF-1 $\alpha$ -Bildung in Normoxie konnte bis heute nicht gefunden werden. Da HIF-1 $\alpha$  aber ein entscheidendes Glied einer Kette von Sauerstoff-regulierten Genen ist, könnte die Aufklärung des Funktionsmechanismus weitreichende Erkenntnisse für die Behandlung von Krankheiten ergeben, die mit einer erhöhten Zytokinausschüttung einhergehen. Solche Krankheiten sind neben Tumorleiden zum Beispiel auch chronisch entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis oder die Arteriosklerose.

Die Ovarialkarzinom-Zelllinien HTB-77 und OVCAR-3 wurden mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  versetzt und für 3 Stunden in Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Übereinstimmend zu Studien anderer zeigte sich in der PCR besonders unter Normoxie eine Induktion der HIF-1 $\alpha$ -Expression unter IL-1 $\beta$ -Einfluss.

Auch der Western Blot von Extrakten der Karzinomzellen, die mit 500 pg/ml IL-1 $\beta$  für 3 Stunden inkubiert wurden, zeigte eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$ -Menge unter Normoxie bei den Zytokin-behandelten Proben. IL-1 $\beta$  scheint demnach über einen bisher unbekannten Mechanismus die Menge des HIF-1 $\alpha$ -Proteins in Ovarialkarzinomen zu erhöhen, was auch schon von anderen Geweben berichtet wurde (Thornton et al. 2000).

Warum es unter dem Einfluss von Zytokinen zu einer Veränderung der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression und der Proteinmenge kommt, ist noch unklar. Da die Steuerung der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge an mehreren Stellen reguliert wird, gäbe es prinzipiell mehrere Angriffspunkte für das Zytokin. Möglich wäre zum Beispiel ein direkter Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die PHDs.

Um Anhaltspunkte für weitere Effekte des IL-1 $\beta$  auf HIF-1 zu bekommen, wurde die Aktivität des HIF-1-Komplexes untersucht. Dazu wurde ein EMSA mit Extrakten aus normoxischen und hypoxischen Ovarialkarzinom-Zellen durchgeführt, wobei ein Teil der Zellen mit IL-1 $\beta$  behandelt wurde. Anhand dieses Experiments wurde nachgewiesen, dass es nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  tatsächlich zu einer gesteigerten Protein-DNA-Interaktion kommt, wobei ein Protein des vermehrt gebundenen Komplexes anhand des Supershifts sicher als HIF-1 $\alpha$  identifiziert werden konnte. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen an Hepatomzellen (Hellwig-Bürgel et al., 1999) überein.

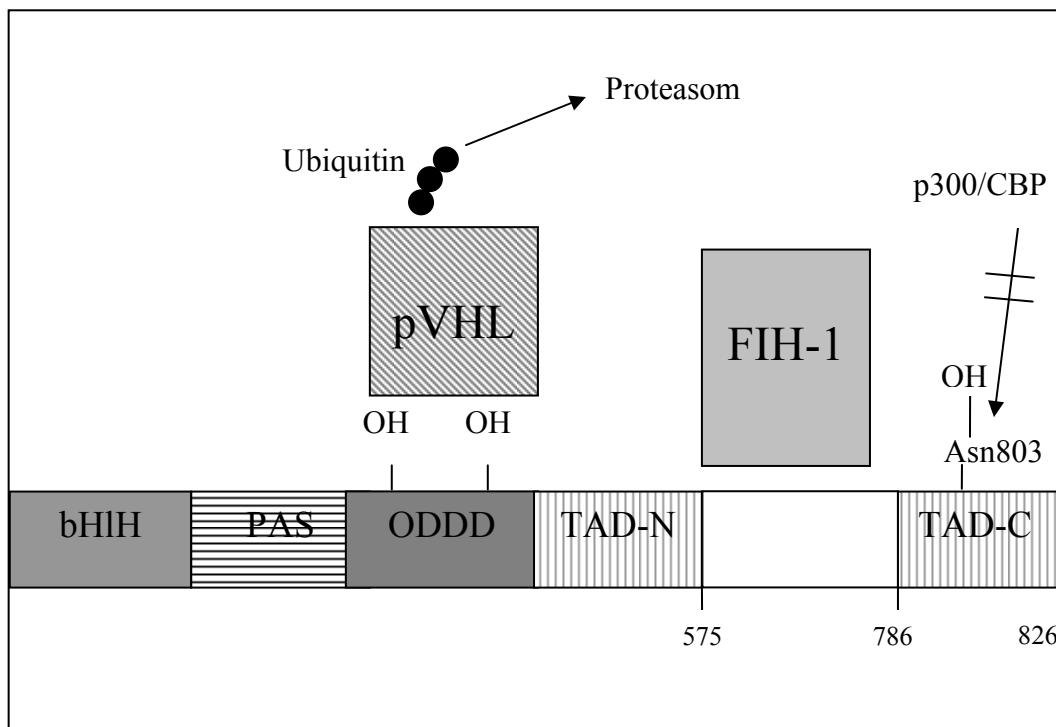
Nachdem die Bindung von HIF-1 $\alpha$  an die DNA bestätigt war, musste nun mithilfe eines Reportergenassays überprüft werden, ob das gebundene Protein auch zu einer Induktion der HIF-1-Zielgene führt. Hierfür wurde ein Reportergenassay mit dem Vektor pH3SVL durchgeführt, der über 6 HIF-Bindungsstellen verfügt. Es zeigte sich überraschenderweise eine Abnahme der Luciferaseaktivität bei den mit IL-1 $\beta$  behandelten Zellen. Demnach bindet das unter IL-1 $\beta$  gebildete Protein zwar im Kern an die DNA, fördert aber nicht die Transkription-steigernde Aktivität des HIF-1, sondern reduziert sie sogar.

Dieses überraschende Resultat führte zu der Hypothese, dass sich ein Angriffspunkt von IL-1 $\beta$  in der TAD-C des HIF-1 $\alpha$  befindet, da in dieser Domäne ein entscheidender Punkt für die Regulation der Transkriptionsaktivität des HIF-1-Komplexes liegt (Chun et al., 2002). Von unbehandelten Zellen ist nämlich bekannt, dass die Aminosäure Asn803 im nicht-hydroxylierten Zustand mit den Transkriptionsfaktoren p300/CBP interagiert und somit die Transkriptionsaktivität des HIF-1 $\alpha$  unterstützt.

Um einen eventuellen Einfluss des Zytokins auf die TAD-C nachzuweisen, wurde ein chimeres Aktivator/Reporter-System verwendet. In diesem wurde die TAD-C des HIF-1 $\alpha$  mit dem Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe fusioniert und als Aktivator verwendet. Als Reporter wurde ein Gal4-Luciferase-Plasmid benutzt. Die Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und mit oder ohne IL-1 $\beta$  unter Normoxie und

Hypoxie inkubiert. Der Reportergenssay zeigte bei den Kontrollproben unter Hypoxie eine deutliche Steigerung der Luciferaseaktivität. Demnach scheint die TAD-C auszureichen, um einen großen Teil der Transkriptionsaktivität von HIF-1 $\alpha$  zu vermitteln. Bei den mit IL-1 $\beta$  behandelten Zellen konnte interessanterweise beobachtet werden, dass sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie die Luciferaseaktivität geringer war als bei den Kontrollen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass IL-1 $\beta$  die Aktivität der TAD-C des HIF-1-Komplexes hemmt und die Domäne in der Art modifiziert, dass das Protein zwar noch im Kern an die DNA binden kann, die Transkriptionsaktivität jedoch vermindert wird.

Es stellt sich jetzt die Frage, an welcher Stelle genau dieser von aa.786-826 reichenden Domäne die Modifikationen stattfinden. Da von der Aminosäure Asn803 bekannt ist, dass sie eine entscheidende Rolle in der Transkriptionsaktivität von HIF-1 $\alpha$  einnimmt, wurde die Vermutung aufgestellt, dass IL-1 $\beta$  durch Beeinflussung des FIH-1 an dieser Aminosäure angreift. Denkbar ist aber unter anderem auch, dass IL-1 $\beta$  die Interaktionen von Asn803 mit den Transkriptionsfaktoren p300/CBP unterbindet und somit die Transkriptionsaktivität von HIF-1 $\alpha$  erheblich mindert.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung der regulatorischen Abschnitte des HIF-1 $\alpha$ -Proteins:** In der TAD-C liegt an Position 803 die Aminosäure Asparagin (Asn803), die eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkriptionsaktivität des HIF-1 $\alpha$ -Gens einnimmt. Wird Asn803 nicht in einem Sauerstoff-abhängigen Prozess hydroxyliert, können die Transkriptionsfaktoren p300/CBP binden. pVHL ist Teil des proteasomalen Ubiquitin-Systems, das den Abbau von Proteinen vermittelt. Kommt es unter Normoxie zu Prolinhydroxylierungen in der ODDD von HIF-1 $\alpha$ , kann das Protein binden und den HIF-1 $\alpha$ -Abbau induzieren.

#### 4.4 Die Expression von VEGF unter Einfluss von IL-1 $\beta$

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse stellte sich die Frage, wie das VEGF als wichtiges Zielgen von HIF-1 $\alpha$  auf die Inkubation mit IL-1 $\beta$  reagiert. Da im Reporterassay nachgewiesen werden konnte, dass das vermehrt vorhandene HIF-1 $\alpha$ -Protein nicht transaktivierend wirkt, wäre zu erwarten gewesen, dass die Expression von VEGF vermindert ist.

Die daraufhin mit den Ovarialkarzinom-Zellen durchgeführten Versuche erbrachten aber den Nachweis, dass auch die VEGF-Expression besonders bei Normoxie unter

Zytokineinfluss gesteigert ist. Diese Beobachtung deckt sich mit in der Literatur zu findenden Berichten von anderen Geweben (Jackson et al., 1997; Akagi et al., 1999; Saijo et al., 2002). Auch die Bestimmung der Proteinmenge im Zellüberstand mithilfe des ELISAs zeigte eine Zunahme der VEGF-Menge unter Zytokineinfluss.

Nachdem HIF-1 $\alpha$  offensichtlich nicht der Induktor der erhöhten VEGF-Synthese unter IL-1 $\beta$  ist, muss nach anderen Erklärungen für diesen Effekt gesucht werden. Sicher scheint jedoch zu sein, dass die vermehrte VEGF-Expression unter IL-1 $\beta$  unabhängig von dem Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  abläuft.

In der Literatur wird von Versuchen mit dem Zytokin Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) an humanen Fibrosarkomen berichtet, bei denen sich eine Erhöhung der VEGF-mRNA unter Hypoxie zeigte, die durch einen Aktivator Protein-1-abhängigen (AP-1) Mechanismus vermittelt wurde (Shih et al., 2001). Da TGF- $\beta$  und IL-1 $\beta$  beide derselben Familie der Zytokine angehören, lässt sich die gesteigerte VEGF-Expression unter Normoxie und Hypoxie unter Umständen auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 zurückführen. Wenn dies zutrifft, würde das bedeuten, dass IL-1 $\beta$  zum einen direkt das HIF-1 $\alpha$ -Protein beeinflusst, indem es seine Transkriptionsaktivität durch Veränderungen im C-Terminus hemmt, und zum anderen den Transkriptionsfaktor AP-1 rekrutiert, um hierdurch andere Gene zu aktivieren.

In mehreren Studien wird die durch IL-1 $\beta$ -induzierte Hemmung der EPO-Expression beschrieben (Jelkmann et al., 1990; Fandrey et al., 1994). Über welchen Weg/Mediator diese Reduktion der Expression vermittelt wird, ist bisher nicht geklärt. In nicht mit Zytokin-inkubierten Zellen zeigte sich stets eine Induktion der EPO-Expression unter Hypoxie, die direkt auf eine Aktivierung des HIF-1-Komplexes zurückzuführen ist (Wang et al., 1993), da EPO ebenso wie VEGF ein wichtiges Zielgen von HIF-1 ist. In Experimenten ließ sich die Reduktion der EPO-Expression unter IL-1 $\beta$  aufheben, wenn zyklisches AMP (cAMP) hinzugegeben wurde (Fandrey

et al., 1994). Die Tatsache, dass cAMP ein Substrat des CREB-bindenden Proteins (CBP) ist, das mit der nicht-hydroxylierten Aminosäure Asn803 des HIF-1 $\alpha$ -Gens interagiert, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es durch IL-1 $\beta$  zu Veränderungen im C-Terminus kommt, die die Transkriptionsaktivität des HIF-1 $\alpha$ -Proteins beeinflussen.

Deshalb lässt sich die Hemmung der Hypoxie-induzierten EPO-Expression durch IL-1 $\beta$  sehr gut durch eine verminderte Transkription-steigernde Aktivität von HIF-1 erklären.

Für die Expression des VEGF dagegen müssen neben den beschriebenen Mechanismen eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren in Betracht gezogen werden, die potentiell durch IL-1 $\beta$  induziert werden können. Die Beschreibung des endgültigen Mediators und seines Angriffspunktes wird das Ziel weiterer Forschungen sein.

## 5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) und sein Zielgen Vascular endothelial growth factor (VEGF), ein wesentlicher Induktor der Gefäßneubildung in hypoxischen Geweben, spielen eine entscheidende Rolle für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von HIF-1 und Expression von VEGF als HIF-1-Zielgen sowohl durch einen verminderten Sauerstoffpartialdruck als auch durch den Einfluss des Zytokins Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gefördert wird. Obwohl sich im Electrophoretic-mobility-shift-assay (EMSA) zeigte, dass das unter Zytokin-Einfluss vermehrt gebildete HIF-1 $\alpha$  im Kern als HIF-1-Komplex an die DNA bindet, wurde im Reporter-genassay mit dem HIF-spezifischen Vektor pH3SVL eine verminderte Transaktivität des HIF-1-Komplexes nach IL-1 $\beta$  Behandlung festgestellt. Da die Transaktivität des HIF-1 in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD-C) des Proteins reguliert wird, wurde ein chimeres Aktivator/Reporter-System angewandt, bei dem die TAD-C von HIF-1 mit dem Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe fusioniert wurde. Im anschließend durchgeführten Assay mit dem Reporter-gen Luciferase war bei den Kontrollproben eine Zunahme der Luciferaseaktivität unter Hypoxie sichtbar. Demnach scheint die TAD-C auszureichen, um die Transaktivität von HIF-1 zu vermitteln. Die mit IL-1 $\beta$  versetzten Zellen zeigten sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie eine deutlich verminderte Luciferaseaktivität. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass IL-1 $\beta$  die TAD-C von HIF-1 in der Art modifiziert, dass zwar die Bindung von HIF-1 an die DNA möglich ist, die Transkriptionsaktivität aber gehemmt wird. Daher muss angenommen werden, dass die unter Zytokin-Einfluss vermehrte VEGF-Expression unabhängig von dem Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  stattfindet.

Durch das genaue Verständnis der durch IL-1 $\beta$  hervorgerufenen Veränderungen wird erhofft, entscheidende Verbesserungen in den Therapiemöglichkeiten bei Erkrankungen zu erlangen, die mit einem reduzierten Sauerstoffpartialdruck und/oder einer gesteigerten Zytokinsekretion einhergehen.



## 6. Literaturverzeichnis

1.) Abu-Jawdeh, G.M., Faix, J.D., Niloff, J., Tognazzi, K., Mansear, E., Dvorak, H.F., Brown, L.F. (1996):

Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms.

Lab Invest 74, 1105-1115.

2.) Akagi, Y., Liu, W., Xie, K., Zebrowski, B., Shaheen, R.M., Ellis, L.M. (1999):

Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1 beta.

Br J Cancer 10, 1506-1511.

3.) Berse, B., Hunt, J.A., Diegel, R.J., Morganelli, P., Yeo, K.T., Brown, F., Fava, R.A. (1999):

Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts.

Clin Exp Immunol 115, 176-182.

4.) Blancher, C., Moore, J.W., Robertson, N., Harris, A.L. (2001):

Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) Gene Mutations on Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , and Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Their Regulation by the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signaling Pathway.

Cancer Res 61, 7349-7355.

5.) Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. (2001):

Pathologie.

2. vollst. überarb. Aufl.; S. 163-193. München, Jena: Urban & Fischer-Verlag.

6.) Buchler, P., Reber, H.A., Buchler, M., Shrinkante, S., Buchler, M.W., Friess, H., Semenza, G.L., Hines, O.J. (2003):

Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer.

Pancreas 1, 56-64.

7.) Camenisch, G., Stroka, D.M., Gassmann, M., Wenger, R.H. (2001):

Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression.

Eur J Physiol 443, 240-249.

8.) Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987):

Singel-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem 162, 156-159.

9.) Chun, Y.S., Kim, M.S., Park, J.W. (2002):

Oxygen-dependent and -independent Regulation of HIF-1alpha.

J Korean Med Sci 17, 581-588.

10.) Damert, A., Ikeda, E., Risau, W. (1997):

Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells.

Biochem J 327, 419-423.

11.) De Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R., DeLuca, M. (1986):

Cloning firefly luciferase.

Methods Enzymol 133, 3-14.

12.) Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983):

Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei.

Nucl Acids Res 11, 1475-1489.

13.) Doldi, N., Bassan, M., Gulisano, M., Broccoli, V., Boncinelli, E., Ferrari, A. (1996):

Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in human ovarian and endometrial cancer.

Gynecol Endocrinol 10, 375-382.

14.) El Awad, B., Kreft, B., Wolber, E.M., Hellwig-Bürgel, T., Metzen, E., Fandrey, J., Jelkmann, W. (2000):

Hypoxia and interleukin-1 $\beta$  stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells.

Kidney Int 58, 43-50.

15.) Elkins, J.M., Hewitson, K.S., McNeill, L.A., Seibel, J.F., Schlemminger, I., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Schofield, C.J. (2003):

Structure of Factor-inhibiting Hypoxia-inducible Factor (FIH) Reveals Mechanism of Oxidative Modification of HIF-1 $\alpha$ .

J Biol Chem 278, 1802-1806.

16.) Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y. (1997):

A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development.

Proc Natl Acad Sci USA 94, 4274-4278.

17.) Epstein, A.C., Gleadle, J., McNeill, J.M., Hewitson, L.A., O'Rourke, K.S., Mole, J., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2001):

C.elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.

Cell 107, 43-54.

18.) Fandrey, J., Huwiler, A., Frede, S., Pfeilschifter, J., Jelkmann, W. (1994):

Distinct signaling pathways mediate phorbol-ester-induced and cytokine-induced inhibition of erythropoietin gene expression.

Eur J Biochem 226, 335-340.

19.) Ferrara, N., Davis-Smyth, T. (1997):

The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor.

Endocr Rev 18, 4-25.

20.) Folkman, J. (2002):

Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.

Semin Oncol. 29, 15-18.

21.) Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L. (1996):

Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.

Mol Cell Biol 16, 4604-4613.

22.) Freeman, W.A., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999):

Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential.

Biotech 26, 112-122, 124-125.

23.) Gassmann, M., Fandrey, J., Bichet, J., Wartenberg, M., Marti, H.H., Bauer, C., Wenger, R.H., Acker, H. (1996):

Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells.

Proc Natl Acad Sci USA 93, 2867-2872.

24.) Gassmann, M., Wenger, R.H. (1997):

HIF-1, a mediator of the molecular response to hypoxia.

News Physiol Sci 12, 214-218.

25.) Gleadle, J.M., Ratcliffe, P.J. (1998):

Hypoxia and the regulation of gene expression.

Mol Med Today 4, 122-129.

26.) Goldberg, M.A., Schneider, T.J. (1994):

Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin.

J Biol Chem 269, 4355-4359.

27.) Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., Bradfield, C.A. (2000):

The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 40, 519-561.

28.) Gu, Y.Z., Moran, S.M., Hogenesch, J.B., Wartman, L., Bradfield, C.A. (1998):

Molecular characterization and chromosomal localization of a third  $\alpha$ -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 $\alpha$ .

Gene Exp 7, 205-213.

29.) Guidi, A.J., Abu-Jawdeh, G., Berse, B., Jackman, R.W., Tognazzi, K., Dvorak, H.F., Brown, L.F. (1995):

Angiogenesis and vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression in cervical neoplasia.

J Natl Cancer Inst. 87, 1237-1245.

30.) Guidi, A.J., Abu-Jawdeh, G., Tognazzi, K., Dvorak, H.F., Brown, L.F. (1996): Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma.

Cancer 78, 454-460.

31.) Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., Jelkmann, W. (1999): Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulate DNA Binding of Hypoxia-Inducible Factor-1.

Blood 94, 1561-1567.

32.) Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A., Hankinson, O. (1991):

Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor.

Science 252, 954-958.

33.) Hollingsworth, H.C., Kohn, E.C., Steinberg, S.M., Rothenberg, M.L., Merino, M.J. (1995):

Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma.

Am J Pathol 147, 33-41.

34.) Horiuchi, A., Imai, T., Shimizu, M., Oka, K., Wand, C., Nikaido, T., Konishi, I. (2002):

Hypoxia-induced changes in the expression of VEGF, HIF-1  $\alpha$  and cell cycle-related molecules in ovarian cancer cells.

Anticancer Res 5, 2697-2702.

35.) Höckel, M., Vaupel, P. (2001):

Biological Consequences of Tumor Hypoxia.

Sem Oncol 28, 36-41.

36.) Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., Bunn, H.F. (1996):

Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit.

J Biol Chem 271, 32253-32259.

37.) Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H.F. (1998):

Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway.

Proc Natl Acad Sci USA 95, 7987-7992.

38.) Ibelgaufts, H. (2003):

Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia.

Online-Publikation; [www.copewithcytokines.de](http://www.copewithcytokines.de).

39.) Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin, W.G. (2001):

HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implication for O<sub>2</sub> sensing.

Science 292, 464-468.

40.) Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001):

Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation.

Science 292, 468-472.

41.) Jackson, J.R., Minton, J.A., Ho, M.L., Wei, N., Winkler, J.D. (1997):

Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1 $\beta$ .

J Rheumatol 7, 1253-1259.

42.) Jelkmann, W., Wolff, M., Fandrey, J. (1990):

Modulation of the production of erythropoietin by cytokines: in vitro studies and their clinical implications.

Contrib Nephrol. 87, 68-77.

43.) Jelkmann, W. (1992):

Erythropoietin: Structure, control of production, and function.

Physiol Rev 72, 449-489.

44.) Jelkmann, W. (1998):

Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production.

J Interferon Cytokine Res 18, 555-559.

45.) Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., Poellinger, L. (1999):

Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 $\alpha$  by the ubiquitin-proteasome pathway.

J Biol Chem 274, 6519-6525.



- 46.) Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. (1997):  
Medizinische Mikrobiologie.  
9. Aufl.; S. 81-86. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
- 47.) Kim, K.W., Choi, K.S., Bae, M.K., Jeong, J.W., Moon, H.E. (2003):  
Hypoxia-induced Angiogenesis during Carcinogenesis.  
J Biochem Mol Biol 1, 120-127.
- 48.) Koppenwallner, V. (2003):  
Ovarialkarzinom.  
Online-Publikation; [www.gentest24.de](http://www.gentest24.de).
- 49.) Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I., Plate, K.H. (2000):  
Up-Regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function.  
Oncogene 19, 5435-5443.
- 50.) Kutteh, W.H., Kutteh, C.C. (1992):  
Quantitation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 in the effusions of ovarian epithelial neoplasms.  
Am J Obstet Gynecol 167, 1864-1869.
- 51.) Laderoute, K.R., Calaoagan, J.M., Gustafson-Brown, C., Knapp, A.M., Li, G.C., Mendonca, H.L., Ryan, H.E., Wang, Z., Johnson, R.S. (2002):  
The response of c-jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 alpha dependent.  
Mol Cell Biol 22, 2515-2523.

52.) Laemmli, U.K. (1970):

Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685.

53.) Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., Gorman, J.J., Whitelaw, M.L. (2002):

Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch.

Science 295, 858-861.

54.) Lane, D., Prentki, P., Chandler, M. (1992):

Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions.

Microbiol Rev 56, 509-528.

55.) Levy, A.P., Levy, N.S., Goldberg, M.A. (1996):

Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia.

J Biol Chem 271, 2746-2753.

56.) Li, J., Perrella, M.A., Tsai, J.C., Yet, S.F., Hsieh, C.M., Yoshizumi, M., Patterson, C., Endege, W.O., Zhou, F., Lee, M.E. (1995):

Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression by Interleukin-1 $\beta$  in Rat Aortic Smooth Muscle Cells.

Biochem Mol Biol 270, 308-312.

57.) Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S. (1995) :

Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells.

Circ Res 77, 638-643.

- 58.) Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998):  
Bioanalytik.  
1. Aufl.; S. 35-103, 571-781. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad.-Verlag.
- 59.) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951):  
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.  
J Biol Chem 193, 265-275.
- 60.) Lu, Q., Hutchins, A.E., Doyle, C.M., Lundblad, J.R., Kwok, R.P. (2003):  
Acetylation of CREB by CBP enhances CREB-dependent transcription.  
J Biol Chem 278, 15727-15734.
- 61.) Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001):  
Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains  
activated by prolyl hydroxylation.  
EMBO J 20, 5197-5206.
- 62.) Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L.,  
Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (1997):  
Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences  
both angiogenesis and tumor growth.  
Proc Natl Acad Sci USA 94, 8104-8109.
- 63.) Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C.,  
Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J. (1999):  
The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-  
dependent proteolysis.  
Nature (London) 399, 271-275.

64.) McNeill, L.A., Hewitson, K.S., Claridge, T.D., Seibel, J.F., Horsfall, L.E., Schofield, C.J. (2002):

Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the  $\beta$ -carbon of asparagine-803.

Biochem J 367, 571-575.

65.) Mesiano, S., Ferrara, N., Jaffe, R.B. (1998):

Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer.

Am J Path 153, 1249-1256.

66.) Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M., Michiels, C. (2001):

Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation.

Free Radical Biology & Medicine 31, 847-855.

67.) Mitchell, P.J., Tjian, R. (1989):

Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.

Science 245, 371-378.

68.) Müller, H-J. (2001):

Polymerase-Kettenreaktion.

1. Aufl.; Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad.-Verlag.

69.) Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (1994):

The Polymerase Chain Reaction.

Birkhäuser, Boston.

70.) Nagy, J.A., Masse, E.M., Herzberg, K.T., Meyers, M.S., Yeo, K.T., Yeo, T.K., Sioussat, T.M., Dvorak, H.F. (1995):

Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation.

Cancer Res 55, 360-368.

71.) Nakayama, K., Kanzaki, A., Hata, K., Katabuchi, H., Okamura, H., Miyazaki, K., Fukumoto, M., Takebayashi, Y. (2002):

Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) gene expression in human ovarian carcinoma.

Cancer Lett 176, 215-223.

72.) Nordsmark, M., Overgaard, M., Overgaard, J. (1996):

Pretreatment oxygenation predicts radiation in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.

Radiother Oncol 41, 31-39.

73.) Olson, T.A., Mohanraj, D., Carson, L.F., Ramakrishnan, S. (1994):

Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries.

Cancer Res 54, 276-280.

74.) O'Neill, L.A.J. (1995):

Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin-1.

Biochim Biophys Acta 1266, 31-44.

75.) O'Rourke, J.F., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Stratford, I.J., Wood, S.M., Ratcliffe, P.J. (1997):

Hypoxia response element.

Oncol Res 9, 327-332.

- 76.) Pagé, E.L., Robitaille, G.A., Pouyssegur, J., Richard, D.E. (2002):  
Induction of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  by Transcriptional and Translational Mechanisms.  
J Biol Chem 277, 48403-48409.
- 77.) Paley, P.J., Staskus, K.A., Gebhard, K., Mohanraj, D., Twiggs, L.B., Carson, L.F., Ramakrishnan, S. (1997):  
Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma.  
Cancer 80, 98-106.
- 78.) Perez, R.P., Godwin, A.K., Hamilton, T.C., Ozols, R.F. (1991):  
Ovarian cancer biology.  
Semin Oncol 18, 186-204.
- 79.) Pingoud, A., Urbanke, C. (1997):  
Arbeitsmethoden der Biochemie.  
1. Aufl.; S. 123 ff. Berlin, New York: de Gruyter-Verlag.
- 80.) Poltorak, Z., Cohen, T., Neufeld, G. (2000):  
Die VEGF-„Splice“-Varianten: Eigenschaften, Rezeptoren und Anwendung in der Therapie ischämischer Erkrankungen.  
Herz 25, 126-129.
- 81.) Ramlau, J. (1987):  
Use of secondary antibodies for visualization of bound primary reagents in blotting procedures.  
Electrophoresis 8, 398.

- 82.) Saijo, Y., Tanaka, M., Miki, M., Usui, K., Suzuki, T., Maemondo, M., Hong, X., Tazawa, R., Kikuchi, T., Matsushima, K., Nukiwa, T. (2002):  
Proinflammatory Cytokine IL-1 $\beta$  promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenetic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction.  
J Immunol 169, 469-475.
- 83.) Saklatvala, J., Davis, W., Guesdon, F. (1996):  
Interleukin 1 (IL1) and tumor necrosis factor (TNF) signal transduction.  
Phil Trans R Soc Land 351, 151-157.
- 84.) Salceda, S., Caro, J. (1997):  
Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions.  
J Biol Chem 272, 22642-22647.
- 85.) Salven, P., Hattori, K., Heissig, B., Rafii, S. (2002):  
Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) promotes angiogenesis in vivo via VEGF-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion.  
FASEB J 16, 1471-1473.
- 86.) Sambrook, J., Fritsch, F., Maniatis, T. (1989):  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual.  
2. Aufl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 1-3.
- 87.) Sandner, P., Gess, B., Wolf, K., Kurtz, A. (1996):  
Divergent regulation of vascular endothelial growth factor and of erythropoietin gene expression in vivo.  
Eur J Physiol 431, 905-912.

- 88.) Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M., Schaffner, W. (1989):  
Rapid detection of octamer binding proteins with „mini-extracts“ prepared from a small number of cells.  
Nucl Acids Res 17, 6419.
- 89.) Schrimpf, G. (2002):  
Gentechnische Methoden.  
3. Aufl.; Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad.-Verlag.
- 90.) Semenza, G.L., Wang, G.L. (1992):  
A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.  
Mol Cell Biol 12, 5447-5454.
- 91.) Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. (1983):  
Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.  
Science 279, 983-985.
- 92.) Shih, S.C., Claffey, K.P. (2001):  
Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF-beta activation of VEGF expression.  
Growth Factors 19, 19-34.
- 93.) Stauber, M., Weyerstahl, T. (2001):  
Duale Reihe – Gynäkologie und Geburtshilfe.  
1.Aufl.; S. 288-295. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.



94.) Thornton, R.D., Lane, P., Borghaei, R.C., Pease, E.A., Caro, J., Mochan, E. (2000):

Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts.

Biochem J 350, 307-312.

95.) Vaupel, P., Kelleher, D.K., Höckel, M. (2001):

Oxygenation Status of Malignant Tumors: Pathogenesis of Hypoxia and Significance for Tumor Therapy.

Sem Oncol 28, 29-35

96.) Wang, G.L., Semenza, G.L. (1993):

Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia.

J Biol Chem 268, 21513-21518.

97.) Wang, G.L., Semenza, G.L. (1995):

Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.

J Biol Chem 270, 1230-1237.

98.) Wenger, R.H. (2002):

Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression.

FASEB J 16, 1151-1162.

99.) Wenger, R.H. (2000):

Mammalian Oxygen Sensing, Signaling and Gene Regulation.

J. Exp Biol 203, 1253-1263.

- 100.) White, F.C., Carroll, S.M., Kamps, M.P. (1995):  
VEGF mRNA is reversibly stabilized by hypoxia and persistently stabilized in VEGF-overexpressing human tumor cell lines.  
Growth Factors 12, 289-301.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

aa.	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AhR	Dioxin Rezeptor (Aryl hydrocarbon Receptor)
Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	AhR Nuclear Translocator
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CBP	CREB-bindendes Protein
CD	Cluster of Differentiation
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Da	Dalton

---

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
EMSA	Electrophoretic-mobility-shift-assay
EPO	Erythropoietin
FCS	Fetales Kälberserum
FIH-1	Factor-inhibiting HIF-1
GTC	Guanidiniumisothiocyanat
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	Hypoxia-response element
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
Mg	Magnesium
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Botenribonukleinsäure (messenger RNA)
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
ODDD	Oxygen-dependent degradation domain
PAS	Per/ARNT/Sim (Akronym)

---

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PHD	Prolylhydroxylasen
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAD-C	C-terminale Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 8. Anhang

### 8.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav®	H+P (Oberschleißheim)
Brutschrank	Hera cell	Heraeus (Hanau)
Elektroporationsgerät	GenePulser II	Bio-Rad (München)
Feinwaage	Kern 572	Kern (Balingen-Frommern)
Gelkammern	Gelkammern	Werkstatt des Physiologischen Instituts (Bonn)
Heizblock	HLC TM 130-6	HLC (Bovenden)
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop	Ck 40-SLP	Olympus (Hamburg)
PCR-Maschine	Perkin Elmer	Perkin-Elmer (Langen)
PCR-Maschine	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
PCR Thermocycler für real time PCR	GeneAmp® 5700	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Photometer	SmartSpec™ 3000	Eppendorf (Hamburg)
Schüttler	Titramax 101	Heidolph (Schwabach)
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph (Schwabach)
Spannungsquelle	PowerPac 300	Bio-Rad (München)
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus (Hanau)
Thermocycler für die RT	Mastercycler 5330	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer	Vortex Genie-2	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	GFL®	GFL (Burgwedel)

(Fortsetzung)

Western Blot-System	MiniProtean® 3 cell	Bio-Rad (München)
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus (Hanau)

## 8.2 Zellkulturartikel

Sämtliche Zellkulturartikel wurden von der Firma Greiner (Nürtingen) bezogen.

## 8.3 Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Aprotinin	Invitrogen (San Diego, USA)
BSA, Albumin Fraktion 5	Sigma (Deisenhofen)
Medium RPMI 1640 mit L-Glutamin	Bio Whittaker Europe (Verviers, Belgien)
Versene 1:5000 Gibco™	Invitrogen (San Diego, USA)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka Chemie (Neu Ulm)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Guanidiniumthiocyanat (GTC)	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natrium-Acetat	Sigma (Deisenhofen)
Phenol	Sigma (Deisenhofen)
Phenol-Chloroform-Isoamyl	Sigma (Deisenhofen)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Agarose	Gibco BRL (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
NTP	Promega (Mannheim)
Oligo dT	Promega (Mannheim)
PCR-Mix	Gibco BRL (Karlsruhe)
Primer	Gibco BRL (Karlsruhe)
Quantifizierungs-Mix	Eurogentex (Belgien)
Reverse Transkriptase (RT)	Promega (Mannheim)
RT-Mix	Promega (Mannheim)
Taq Polymerase	Gibco BRL (Karlsruhe)
Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad (München)
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Sigma (Deisenhofen)
P-Kumarinsäure	Sigma (Deisenhofen)
Luminol	Sigma (Deisenhofen)
Magermilchpulver Natura flor	Töpfer (Allgäu)
Molekulargewichtsmarker SDS-7B	Sigma (Deisenhofen)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Deisenhofen)
3,3',5',5'-Tetramethylbenzidine (TEMED)	Sigma (Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)
Peroxidase	Sigma (Deisenhofen)
Rekombinantes humanes VEGF	R&D-Systems (Minneapolis, USA)
Capture-Antikörper	R&D-Systems (Minneapolis, USA)
Detection-Antikörper	R&D-Systems (Minneapolis, USA)



Bezeichnung	Firma
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-Adenosintriphosphat	ICN (Eschwege)
Oligonukleotide	MWG (Ebersberg)
Tfx-20-Reagenz	Promega (Mannheim)
Reportergergen-Lysis-Puffer	Promega (Mannheim)

Die HIF-1 $\alpha$ -Antikörper für den Western Blot und den EMSA wurden von der Firma Transduction Laboratories (Heidelberg) bezogen, der Anti-Maus-Antikörper stammt von der Firma Sigma (Deisenhofen).

Die Antikörper für den ELISA wurden von der Firma R&D-Systems (Minneapolis, USA) gekauft.

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  wurde von der Firma Calbiochem (Schweiz) bezogen.

#### 8.4 Weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Gel G30-Säulen	Bio-Rad (München)
Film AGFA cronex 5	AGFA (Mortsel, Belgien)
Filterpapier 3 mm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell (Dassel)

## 9. Danksagung

Besonderen Dank möchte ich sagen Herrn Univ.-Prof. Dr. Joachim Fandrey für die Überlassung des anspruchsvollen Themas, seine vielseitige Unterstützung sowie die Möglichkeit, an seinem Institut diese Arbeit durchführen zu können.

Frau Dr. Stilla Frede danke ich für die intensive Betreuung bei dieser Arbeit und die stete Bereitschaft zur Diskussion aufkommender Fragestellungen.

Frau Patricia Freitag möchte ich danken für die Geduld und Hilfe, die sie bei Laborproblemen und -fragen jeglicher Art aufgebracht hat.

Frau Buena Trinidad und Frau Silke Lauterbach danke ich für die Unterstützung bei den Proteinarbeiten.

## 10. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name	Christina Heilmaier
Geburtsdatum	23. September 1980
Geburtsort	Krefeld

### Schulbildung

08/1987 – 07/1991	katholische Grundschule Gießerpfad, Krefeld
08/1991 – 06/1998	Marienschule, Krefeld (Gymnasium der Ursulinen)
1998	Abitur

### Hochschulstudium

04/1999 – 03/2001	Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
03/2001	Physikum
04/2001 – 03/2004	Universität Duisburg-Essen
03/2002	1. Staatsexamen
07/2002	USMLE Step 1
02/2004	USMLE Step 2 CK
03/2004	2. Staatsexamen
04/2004 – 03/2005	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
04/2004 – 08/2004	Chirurgie-Tertial am Royal Hobart Hospital, Australien
08/2004 – 12/2004	Radiologie-Tertial am UniversitätsSpital Zürich, Schweiz
05/2005	3. Staatsexamen
06/2005	USMLE Step 2 CS

### Beruflicher Werdegang

seit 07/2005	Assistenzärztin am Institut für Diagnostische Radiologie, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz
--------------	---

**Stipendien**

seit Juni 2002	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
02/2003 – 04/2003	Forschungsstipendium an der Duke University, Durham, North Carolina, USA
04/2004 – 08/2004	Auslandstipendium des Deutschen Famulantenaustausches